

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin und dem Max-Delbrück-Centrum für
Molekulare Medizin, Berlin-Buch

DISSERTATION

Zelluläre Neogenese im adulten murinen cerebralen Cortex

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Dan-Achim Ehninger
aus Stuttgart Bad Cannstatt

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Gutachter: 1. PD Dr. med. Gerd Kempermann
 2. Prof. Dr. med. Jürgen Winkler
 3. Prof. Dr. med. Thomas Deller

Datum der Promotion: 22.09.2003

Tina, meinen Eltern und Geschwistern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	8
1.1	Zellneubildung im adulten ZNS.....	8
1.2	Cerebraler Cortex	11
1.3	Bedingungen einer reizreichen Lebensumgebung (Enriched Environment).....	13
1.4	Körperliche Aktivität.....	16
1.5	Problemstellung und experimenteller Aufbau	17
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Versuchstiere	19
2.2	Versuchsaufbau und –bedingungen	19
2.2.1	Allgemeine Tierhaltungsbedingungen	19
2.2.2	Experimentelles Design	19
2.2.3	Bedingungen einer reizreichen Lebensumwelt (ENR)	20
2.2.4	Standardlaborbedingungen (CTR)	20
2.2.5	Bedingungen körperlicher Aktivität (RUN)	20
2.2.6	BrdU	23
2.2.6.1	Allgemeines.....	23
2.2.6.2	Dosierung	23
2.2.6.3	Applikation.....	25
2.3	Gewebepräparation	25
2.3.1	Narkose	25
2.3.2	Perfusion	25
2.3.3	Extraktion des Gehirns.....	25
2.3.4	Postfixation, Sucrose.....	26
2.3.5	Anfertigung von Schnittserien der Gehirne	26
2.3.6	Lagerung der Hirnschnitte.....	26
2.4	Immunhistochemie.....	26
2.4.1	Vorbehandlung	26
2.4.2	Immunhistochemie	26
2.4.3	Antikörper	27
2.4.3.1	Primärantikörper	28
2.4.3.2	Sekundärantikörper	29
2.5	Quantifizierung BrdU+ Zellen.....	29
2.6	Phänotypisierung BrdU+ Zellen.....	32
2.6.1	Quantitative Phänotypisierung	33
2.6.2	Qualitative Phänotypisierung	33
2.7	Statistik	34

2.8	Methodenkritik.....	34
2.8.1	Präparations- und Abgrenzungsprobleme	34
2.8.2	BrdU als Proliferationsmarker	35
2.8.3	Phänotypisierung.....	35
3	ERGEBNISSE.....	37
3.1	Räumliche Verteilung BrdU-inkorporierender Zellen im cerebralen Cortex (Experiment 1).....	37
3.1.1	Unterschiedliche Dichte BrdU-positiver Zellen in Abhängigkeit von der kortikalen Schicht	37
3.1.2	Die Dichte BrdU-positiver Zellen variierte nur geringfügig in Abhängigkeit von der kortikalen Region	44
3.1.2.1	Dichte BrdU+ Zellen in Abhängigkeit von der kortikalen Region 1 Tag nach BrdU	44
3.1.2.2	Dichte BrdU+ Zellen in Abhängigkeit von der kortikalen Region 4 Wochen nach BrdU.....	44
3.1.2.3	Veränderung der Dichte BrdU+ Zellen zwischen 1 Tag nach BrdU und 4 Wochen nach BrdU	45
3.1.2.4	Zusammenfassung.....	46
3.2	Einfluß von körperlicher Aktivität (RUN) und reizreicher Umwelt (ENR) auf BrdU inkorporierende kortikale Zellen	46
3.2.1	Beinflußt körperliche Aktivität BrdU-inkorporierende kortikale Zellen? 46	
3.2.1.1	Abhängigkeit der Anzahl und Dichte kortikaler BrdU+ Zellen 1 Tag nach BrdU von körperlicher Aktivität	46
3.2.1.1.1	Frontaler Cortex	47
3.2.1.1.2	Cingulärer Cortex.....	48
3.2.1.1.3	Motorischer Cortex	49
3.2.1.1.4	Visueller Cortex	49
3.2.1.2	Abhängigkeit der Anzahl und Dichte kortikaler BrdU+ Zellen 4 Wochen nach BrdU von körperlicher Aktivität	50
3.2.1.2.1	Cingulärer Cortex.....	52
3.2.1.2.2	Motorischer Cortex	52
3.2.1.2.3	Visueller Cortex	54
3.2.1.3	Die Anzahl der BrdU+ Zellen im Gyrus dentatus hippocampi unter körperlicher Aktivität 1 Tag nach BrdU bzw. 4 Wochen nach BrdU 56	
3.2.1.4	Zusammenfassung.....	57
3.2.2	Beeinflußt eine reizreiche Umwelt (ENR) BrdU-inkorporierende kortikale Zellen?.....	58
3.2.2.1	Die Anzahl und Dichte kortikaler BrdU+ Zellen unter ENR 1 Tag nach BrdU	58
3.2.2.1.1	Frontaler Cortex	59
3.2.2.1.2	Cingulärer Cortex.....	60
3.2.2.1.3	Visueller Cortex	60
3.2.2.1.4	Somatosensorischer Cortex.....	61
3.2.2.2	Die Anzahl und Dichte kortikaler BrdU+ Zellen unter ENR 4 Wochen nach BrdU	62
3.2.2.2.1	Frontaler Cortex	63

3.2.2.2.2	Cingulärer Cortex	64
3.2.2.2.3	Motorischer Cortex	65
3.2.2.2.4	Somatosensorischer Cortex	66
3.2.2.2.5	Visueller Cortex	66
3.2.2.3	Anzahl BrdU+ Zellen im Gyrus dentatus hippocampi unter ENR 1 Tag p.i bzw. 4 Wochen nach BrdU	68
3.2.2.4	Zusammenfassung.....	69
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	69
3.3.1	Welche Zellen werden im adulten murinen cerebralen Cortex neu gebildet? 69	
3.3.2	Beeinflußt körperliche Aktivität (RUN) kortikale zelluläre Neogenese?	70
3.3.3	Beeinflußt das Leben in einer reizreichen Umwelt (ENR) kortikale zelluläre Neogenese?.....	70
4	DISKUSSION	71
4.1	Adult kortikal proliferierende Zellen.....	71
4.1.1	Adulte kortikale Gliogenese.....	71
4.1.2	Adulte kortikale Neurogenese.....	77
4.2	Veränderungen kortikaler Zellneubildung unter freiwilliger körperlicher Aktivität.....	79
4.3	Veränderungen kortikaler Zellneubildung unter den Bedingungen reizreicher Lebensumgebung.....	85
5	ZUSAMMENFASSUNG	90

Abkürzungsverzeichnis

BrdU	2-Bromo-5-desoxyuridin
Cing Cx	Cingulärer Cortex
Cx ges	Cortex gesamt
CTR	Standardlaborbedingungen bzw. Experimentalgruppe unter Standardlaborbedingungen
ENR	Reizreiche Umgebung (enriched environment) bzw. Experimentalgruppe unter reizreichen Umgebungsbedingungen
Fro Cx	Frontaler Cortex
GZ	Granuläre Zone (hier: des Gyrus dentatus hippocampi)
Gyr dent	Gyrus dentatus hippocampi
Ins Cx	Insulärer Cortex
Mot Cx	Motorischer Cortex
n.e.	nicht erhoben
RMS	Rostral Migratory Stream
RUN	Körperliche Aktivität bzw. Experimentalgruppe unter körperlicher Aktivität
SGZ	Subgranuläre Zone (hier : des Gyrus dentatus hippocampi)
Som Cx	Somatosensorischer Cortex
SVZ	Subventrikuläre Zone
Vis Cx	Visueller Cortex
*	signifikanter Unterschied

1 Einleitung

1.1 Zellneubildung im adulten ZNS

Schon die ersten autoradiographischen Studien von J. Altman um 1960 zeigten, daß sich teilende Zellen im erwachsenen Zentralnervensystem bei verschiedenen Spezies in weiter Verbreitung vorkommen (Altman and Das, 1967; Altman, 1966 ; Altman and Das, 1965a ; Altman and Das, 1965b).

Altman's Arbeiten wurden anfänglich nur zurückhaltend aufgenommen, widersprachen seine Vorstellungen von adulter zellulärer Plastizität doch dem gemeinhin akzeptierten Paradigma von weitgehender Stabilität der zellulären Elemente des Nervensystems. Die Ressourcen adult gebildeter zentralnervöser Zellen, Stamm- und Vorläuferzellen des ZNS, sind mittlerweile Gegenstand intensiver und vielversprechender Forschung, schwebt doch die Zukunftsvision im Raum, diese endogenen -oder exogen applizierte- Kapazitäten eines Tages zur vielfältigen Behandlung verschiedener neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen nutzen zu können (Le Belle and Svendsen, 2002; Lakatos and Franklin, 2002; Stewart and Przyborski, 2002; Cao et al., 2002; Weissman, 2000; Sinden et al., 2000; Goldman, 1998). Von großem allgemeinem Interesse ist weiterhin die Aufdeckung der physiologischen Funktionen adulter zellulärer Neogenese, insbesondere im Zusammenhang mit der Fähigkeit des ZNS zu plastischen Reaktionen (Nottebohm, 2002; Kempermann, 2002; Cecchi et al., 2001; Gould et al., 1999).

Es gibt regionale Unterschiede, was adulte zentralnervöse Zellneubildung betrifft, sowohl quantitativer als auch qualitativer Art. Nach gegenwärtigem Verständnis ist zwei Gebieten des erwachsenen Gehirns, den sog. neurogenen Regionen, die Bildung neuer Nervenzellen eigen: Das ist zum einen der Gyrus dentatus des Hippokampus (van Praag et al., 2002; Cameron et al., 1993; Kaplan and Hinds, 1977; Altman and Das, 1965a; Altman and Das, 1965b), zum anderen das System Subventikuläre Zone (SVZ), Rostral Migratory Stream (RMS), Bulbus olfactorius (Lois and Alvarez-Buylla, 1993; Alvarez-Buylla and Nottebohm, 1988; Kaplan and Hinds, 1977; Altman and Das, 1965a; Altman and Das, 1965b). Dieses System besteht aus einem Pool sich in

den Seitenwänden der Ventrikel teilenden Zellen, die über den Rostral Migratory Stream (RMS) zum Bulbus olfactorius wandern und dort zu Nervenzellen ausdifferenzieren. Die Existenz adulter Neurogenese im Gyrus dentatus des Hippokampus auch von Menschen (Eriksson et al., 1998) und von nicht-menschlichen Primaten (Kornack and Rakic, 1999; Gould et al., 1999a) ist mittlerweile etabliert und gemeinhin akzeptiert.

Offenkundig ist auch, daß demgegenüber viele Regionen des erwachsenen ZNS unter physiologischen Bedingungen nicht die Fähigkeit, neue Neurone zu bilden, besitzen, d.h. die dort angesiedelten Nervenzellen sind Produkt embryofetaler oder früh postnataler Neurogenese (Rakic, 2002; Kornack and Rakic, 2001; Rakic, 1985; Rakic, 1974). Zu diesen nicht-neurogenen Zonen zählt beispielsweise das Rückenmark, dessen neugebildeten Zellen glialer Natur sind (Horner et al., 2000).

Seit Jahrzehnten kontrovers diskutiert wird, ob der erwachsene Neocortex von Säugetieren neurogen ist. Einige frühe autoradiographische Studien, die die Identifizierung von Zelltypen noch ausschließlich nach morphologischen Kriterien und mit lichtmikroskopischen Verfahren vornahmen, schlugen – nicht unbestrittenerweise (Rakic 1985) - die Existenz kortikaler, adulter Neurogenese unter physiologischen Bedingungen vor (Kaplan, 1981). Doch selbst im Zeitalter fortentwickelter immunhistochemischer Methoden und computergestützter mikroskopischer Techniken herrscht über die Frage der Existenz adulter kortikaler Neurogenese keine Einigkeit. Jüngst wieder entfacht wurde die Kontroverse durch Elisabeth Goulds Meldung, kortikale Neurogenese in Primaten- wie auch Nagerhirnen beobachtet zu haben (Gould et al., 2001; Gould et al., 1999b). Goulds Ergebnis wurde von anderen in Frage gestellt (Rakic, 2002; Kornack and Rakic, 2001; Nowakowski and Hayes, 2000).

Nach Rakic kommt kortikale Neurogenese nur zu ganz bestimmten Entwicklungszeitpunkten des Gehirns vor (Rakic, 2002; Rakic, 1985). Neurone verschiedener kortikaler Schichten und Regionen werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten gebildet. Dabei werden kortikale Neurone in proliferativen Bereichen der Ventrikelwand gebildet und wandern dann in den Cortex aus. Neurone tieferer kortikaler Schichten werden zuerst gebildet, die höherer Schichten wandern vor Erreichen der Endplatzierung durch die früher

gebildeten tiefen Schichten hindurch. Ausnahme ist die kortikale Schicht I, die neuronale Zufuhr während der ganzen Periode der Kortikogenese erhält.

Um so interessanter wird die Frage nach der Existenz adulter kortikaler Neurogenese durch die Tatsachen, daß der adulte Cortex offenkundig multipotente Stammzellen beherbergt, die in vitro Zellen glialen *und* neuronalen Phänotyps hervorbringen können (Arsenijevic et al., 2001; Palmer et al., 1999).

Weithin akzeptiert ist jedoch unterdessen, daß adulte kortikale Neurogenese unter bestimmten, nicht physiologischen Bedingungen vorkommen kann. So konnten Magavi et al. zeigen, daß die umschriebene Laserablation kortikothalamischer Projektionsneurone lokal kortikale Neurogenese induziert (Magavi and Macklis, 2001; Magavi et al., 2000). Gezeigt wurde auch, daß die Induktion eines Schlaganfalls im Tiermodell adulte Neurogenese im Cortex (Jiang et al., 2001) beziehungsweise im Striatum (Arvidsson et al., 2002) auslösen kann.

Wenn auch das Studium der bis dato publizierten Literatur keine letzte Klärung der Frage nach der Existenz adulter kortikaler Neurogenese erlaubt, so besteht doch kein Zweifel, daß es im erwachsenen Cortex in vivo eine relativ große Zahl sich teilender Zellen gibt (Rakic, 2002; Gould et al., 2001; Kornack and Rakic, 2001; Magavi et al., 2000; Gould et al. 1999b; Kaplan and Hinds, 1980; Hommes and Leblond, 1967; Altman, 1966).

Verschiedene Studien befaßten sich mit dem phänotypischen Schicksal dieser Zellen (Gensert and Goldman, 2001; Kornack and Rakic, 2001; Levison et al., 1999; Kaplan and Hinds, 1980; Hommes and Leblond, 1967).

Gemein ist diesen Untersuchungen die Beschreibung glialer Differenzierung kortikal proliferierender Zellen.

Allerdings wurde kaum je eine quantitative Untersuchung der Populationen adult proliferierender kortikaler Zellen vorgenommen, geschweige denn deren Verteilung innerhalb funktionell und anatomisch distinkter kortikaler Regionen und Schichten untersucht und damit die Frage einer möglichen regionalen Spezifität adulter kortikaler Zellneubildung angegangen.

1.2 Cerebraler Cortex

Erste, heute noch weitgehend gültige Versuche, den cerebralen Cortex nach histoarchitektonischen Merkmalen zu differenzieren und zu klassifizieren gehen in das späte 19. und frühe 20. Jahrhundert zurück. Vor allem Karl Brodmann machte sich hierum sehr verdient (Brodmann, 1909).

Der cerebrale Cortex ist eine Gewebestruktur - bei Primaten von gewundener Gestalt - an der äußeren Oberfläche des Gehirns. Seine Dicke variiert regional zwischen 2 und 4 mm und ist bei verschiedenen Spezies relativ invariabel. Die Größe der kortikale Oberfläche dagegen zeigt deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies, von ihr hängt die kortikale Informationsverarbeitungskapazität ab. Man unterscheidet vier Lappen, die nach den benachbarten Schädelknochen benannt sind: der Frontal-, Temporal-, Parietal- und Okzipitallappen. Zusätzlich gehören der insuläre und cinguläre Cortex zum cerebralen Cortex.

Der cerebrale Cortex ist aus verschiedenen Schichten aufgebaut. Die Anzahl der Schichten und ihr innerer Aufbau unterscheiden sich von Region zu Region. Der typische Aufbau des Neocortex zeigt sechs Schichten (Isocortex). Während Schicht I (Molekularschicht) arm an Zellkörpern ist, ist hier der relative Volumenanteile an Dendriten und Axonen hoch. Schicht II (äußere Körnerschicht) und IV (innere Körnerschicht) sind durch kleine Zellkörper gekennzeichnet. Schicht III (äußere Pyramidenschicht) und V (innere Pyramidenschicht) enthalten vor allem pyramidenförmige Zellen. In Schicht VI (multiforme Schicht) finden sich Zellen verschiedenster Gestalt.

Besonders variabel und damit diagnostisch (als Merkmal zur Differenzierung verschiedener kortikaler Regionen) wertvoll ist die regionale Ausprägung von Schicht IV. Kortikale Gebiete mit gewichtigem thalamischem Input wie der visuelle Cortex haben eine ausgeprägt entwickelte innere Körnerschichten (IV). Dagegen hat der motorische Cortex, der nur wenige thalamische Afferenzen erhält, eine nur marginal ausgebildete Schicht IV. Kriterien wie zum Beispiel das Vorhandensein oder die Ausprägung von Schicht IV (Ausprägung einzelner Schichten, allgemeine Zelldichte, besondere Zellformen) nutzte Brodmann zur Aufteilung des Cortex in verschiedene histoarchitektonische Gebiete. Partiell deckt sich die histoarchitektonische Gliederung des Cortex von Brodmann mit funktionellen Eigenschaften

kortikaler Regionen. Allerdings erlaubt eine Klassifizierung kortikaler Gebiete mittels elektrophysiologischer und moderner neuroanatomischer Techniken eine weitere Differenzierung von Brodmanns Arealen.

Während viele lebenserhaltende Funktionen an Rückenmark, Hirnstamm und Diencephalon gebunden sind, vermittelt der cerebrale Cortex höhere kognitive Funktionen. Die wahrscheinlich elementare kortikale Verarbeitungseinheit stellt die kortikale Säule dar, ein Zylinder, der alle Schichten umfaßt und einen Durchmesser von ca. einem Millimeter aufweist (Amaral, 2000). Zu einer kortikalen Einheit gehörige Neurone zeigen sehr ähnliche Antworteigenschaften, was wohl darauf zurückzuführen ist, daß sie ein lokales Netzwerk bilden. Die Anzahl der Neurone, die eine kortikale Säule bilden ist interregional (Ausnahme: visueller Cortex) und bei verschiedenen Spezies recht konstant. Variabel ist die Anzahl kortikaler Säulen, die der gesamte Cortex bei verschiedenen Arten enthält, und damit auch die Informationsverarbeitungskapazität.

Man unterscheidet Cortexareale, die in motorische Funktionen involviert sind, von solchen, die überwiegend der Verarbeitung sensorischer Information dienen. Primär sensorische Areale erhalten direkt thalamische Afferenzen, während der primär motorische Cortex über den Tractus corticospinalis bzw. corticonuclearis direkt mit den motorischen Kerngebieten in Hirnstamm und Rückenmark verbunden ist. Höhere motorische bzw. sensorische kortikale Felder sind den primären übergeordnet und stehen in wechselseitiger Beeinflussung mit diesen. Integrative Leistungen werden von den Assoziationscortices, die mit unterschiedlichen Cortexbereichen in Verbindung stehen, vermittelt. Zu diesen Assoziationscortices zählen im wesentlichen der parieto-temporo-okzipitale, der frontale und der limbische Assoziationscortex (bestehend aus dem orbitofrontalen und cingulären Cortex sowie temporalen Cortexbereichen).

1.3 Bedingungen einer reizreichen Lebensumgebung (Enriched Environment)

In dem 1949 veröffentlichten Buch „The Organisation of Behaviour: A Neuropsychological Theory“ formulierte Donald O. Hebb die Idee und schlug Mechanismen vor, wie Erfahrungen die Eigenschaften des sie aufnehmenden Nervensystems in plastischer Weise modulieren könnten (Hebb, 1949). Hebb stellte in diesem Buch unter anderem die Hypothese auf, dass die zeitgleiche Aktivität von Prä- und Postsynapse zur Verstärkung der Übertragungseigenschaften dieser Synapse führen könnten („Hebb-Synapse“). Für dieses Modell wurden später biologische Entsprechungen gefunden (Langzeitpotenzierung: „LTP“). Weniger bekannt ist, daß Hebb auch hatte beobachten können, daß Ratten aus seinem Labor, die er für eine gewisse Zeit zu sich nach Hause genommen hatte, und die dort Gelegenheit hatten, Haus und Kinder zu explorieren, bessere Problemlösefähigkeiten zeigten, als Ratten, die im Labor verblieben waren (Hebb, 1949). Welche zentralnervösen Prozesse dem zugrunde liegen, schien völlig unklar und ist noch heute Gegenstand intensiver Forschung.

Bennett, Diamond, Krech und Rosenzweig entdeckten zuerst, daß Ratten, die einem formalen Training ausgesetzt worden waren, Veränderungen von Hirngewicht und neurochemische Abweichungen zu Tieren aufwiesen, die nicht dieses Training erfahren hatten (Rosenzweig et al., 1962). Gleichartige Veränderungen konnten sie bei Tieren beobachten, die statt eines formalen Trainings einer stimulusreichen Umgebung („Enriched Environment“) ausgesetzt worden waren (Bennett et al., 1964). Kennzeichen dieser Umgebung ist das Beisammensein vieler Artgenossen in großzügig bemessener Räumlichkeit, die mit diversen Hilfsmitteln, z.B. Klettergerüsten, Laufrädern oder anderen „Spielzeugen“ ausgestattet sind (Bennett et al., 1964; Rosenzweig et al., 1962).

In den folgenden Jahren und Jahrzehnten wurden eine Reihe von biologischen Parametern untersucht, die erfahrungsabhängig variieren, und damit gewissermaßen ein „Gedächtnis“ einer biologischen Struktur für Reizeinwirkungen sind und möglicherweise ein morphologisches, molekulares, und/oder funktionelles Abbild von Lernen und Gedächtnisbildung sein oder zumindest Hinweise auf deren substantielle Grundlage geben könnten. So

konnte ein Effekt einer reizreichen Umgebung (Enriched Environment) auf das Hirngewicht (Mollgaard et al., 1971; Bennett et al., 1964), die kortikale Dicke (Diamond et al., 1966; Diamond et al., 1964), den Acetylcholinesterasegehalt des Gehirns (Bennett et al., 1964), die kortikale neuronale Dichte (Diamond et al., 1964), die Größe kortikaler neuronaler Zellkörper und Zellkerne (Diamond et al., 1964), die Anzahl und Komplexität neuronaler dendritischen Verzweigungen (Black et al., 1987; Greenough and Volkmar, 1973; Volkmar and Greenough, 1972), Anzahl, Verteilung und Art synaptischer Kontakte (Beaulieu and Colonnier, 1989a; Beaulieu and Colonnier, 1989b; Beaulieu and Colonnier, 1987), sowie astrozytäre Veränderungen (Jones et al., 1996; Sirevaag and Greenough, 1991), die möglicherweise im Zusammenhang mit synaptischen Veränderungen zu sehen sind (Meshul et al., 1987), festgestellt werden. Indirekt wurde ein Effekt auf die absolute Gliazellzahl postuliert (Szeligo and Leblond, 1977). Die meisten dieser kortikalen Effekte einer reizreichen Umgebung zeigen eine regional unterschiedlich starke Ausprägung und lassen eine regional spezifische Sensitivität des Cortex auf eine reizreiche Umgebung vermuten (vgl. Kapitel 4.3).

Offensichtlich sind Prozesse von zentralnervöser Zellteilung und Zellneubildung auch erfahrungsabhängig modulierbar. So steigert eine reizreiche Umgebung (Enriched Environment) die Überlebensrate von adult neugebildeten hippocampalen Neuronen oder deren Vorläufern (Kempermann et al., 1997). Resultate von Gould et al. schlagen eine Beteiligung hippocampaler Neurogenese bei hippocampusabhängigem Lernen vor. So konnte eine Steigerung hippocampaler Neurogenese beim Lernen (Gould et al., 1999) sowie die Störung des Lernerfolg durch Blockade hippocampaler Neurogenese gezeigt werden (Shors et al., 2001). Neurogenese im olfaktorischen System ist durch die olfaktorischen Reizwahrnehmung modulierbar (Rochefort et al., 2002; Corotto et al., 1994) und damit auch erfahrungsabhängig.

Wie in v.a. den oberen Abschnitten dieses Kapitels dargelegt, haben die Bedingungen einer reizreichen Umgebung, die wohl zur Beanspruchung verschiedenster Hirnleistungen führen, nicht nur Auswirkungen auf Struktur

und funktionelle Organisation des Hippokampus, sondern hinterlassen auch strukturelle Spuren am Cortex. Auf makroskopischer Ebene sind eine regional spezifische Dickenzunahme des Cortex, auf zellulärer Ebene die Veränderungen an neuronalem Zellkern und –körper, von Art und Menge synaptischer Kontakte, sowie astrozytärer Morphologie und auf molekularer Ebene z.B. die verstärkte Expression von Cholinesterase beschrieben worden (Jones et al., 1996; Jones and Greenough, 1996; Rosenzweig and Bennett, 1996; Sirevaag and Greenough, 1991; Black et al., 1990; Beaulieu and Colonnier, 1989a; Beaulieu and Colonnier, 1989c; Beaulieu and Colonnier, 1987; Black et al., 1987; Turner and Greenough, 1985; Sirevaag and Greenough, 1985; Diamond, et al., 1976; Greenough and Volkmar, 1973; Diamond, et al., 1972; Volkmar and Greenough, 1972; Diamond et al., 1971; Diamond et al., 1966; Bennett et al., 1964; Rosenzweig et al., 1962).

Systematisch erhobene Daten und Experimente unter Anwendung moderner quantitativer mikroskopischer Verfahren liegen hierzu nicht vor. Eine besonders interessante Frage ist, ob die beschriebenen kortikalen Veränderungen mit Veränderungen von kortikaler Proliferation und Zellneubildung einhergehen.

1.4 Körperliche Aktivität

Körperliche Aktivität verbessert kognitive Funktionen und fördert die funktionelle Rehabilitation von neurologischen Schäden (Cotman and Engesser-Cesar, 2002; Taylor et al., 1985).

Es wäre von Interesse vor allem zentralnervöse substantielle Korrelate zu diesen funktionellen Effekten aufzudecken, könnte dies doch Ansatzpunkte für gezielte therapeutische Manipulationen hervorbringen. Bislang ist zwar nicht gesichert, ob die funktionellen Befunde tatsächlich durch einzelne oder die Kombination der aktivitätsinduzierten zentralnervösen zellulären und molekularen Veränderungen erklärt werden. Einzelne Zusammenhänge sind jedoch schon bekannt. So verstärkt körperliche Aktivität, wie auch eine reizreiche Umgebung (Enriched Environment), die Neurogenese im Gyrus dentatus des Hippokampus von Mäusen (van Praag et al., 1999). Die Bildung von Wachstumsfaktoren wird beeinflusst, so die Synthese von bFGF (basic fibroblast growth factor) im Hippokampus verstärkt (Gomez-Pinilla et al., 1998; Gomez-Pinilla et al., 1997). Physische Aktivität führt zur Neubildung von Gefäßen im Kleinhirn, das in entscheidende Funktionen bei der Ausführung motorischer Programme involviert ist (Black et al., 1990). Lokal werden Hirnteile verstärkt perfundiert und Energieträger vermehrt aufgenommen und verbraucht (Delp et al., 2001; Vissing et al., 1996; Gross et al., 1980).

1.5 Problemstellung und experimenteller Aufbau

Im adulten cerebralen Cortex teilen sich offenbar Zellen in nicht unerheblichem Maße (Gould et al., 2001; Kornack and Rakic, 2001; Magavi et al., 2000; Gould et al., 1999b; Rakic, 1985; Kaplan and Hinds, 1980; Hommes and Leblond, 1967; Altman and Das, 1965a). Was für Zellen sich teilen, wie sie differenzieren und ob sich adulte kortikale Zellneubildung in verschiedenen kortikalen Bereichen gleich verhält oder regionale Spezifität zeigt, ist bislang nicht systematisch untersucht worden.

Leben in einer reizreichen Umgebung sowie körperliche Aktivität haben deutliche Wirkungen auf adulte hippocampale Neurogenese (Kempermann et al., 1997). Es sind eine Reihe von Effekten einer reizreichen Umgebung auf den cerebralen Cortex nachgewiesen worden (Jones et al., 1996; Jones and Greenough, 1996; Rosenzweig and Bennett, 1996; Sirevaag and Greenough, 1991; Black et al., 1990; Beaulieu and Colonnier, 1989a; Beaulieu and Colonnier, 1989c; Beaulieu and Colonnier, 1987; Black et al., 1987; Turner and Greenough, 1985; Sirevaag and Greenough, 1985; Diamond et al., 1976; Greenough and Volkmar, 1973; Diamond et al., 1972; Volkmar and Greenough, 1972; Diamond et al., 1971; Diamond et al., 1966; Bennett et al., 1964; Rosenzweig et al., 1962). Unsere Hypothese war, dass körperliche Aktivität und das Leben in einer reizreichen Umgebung kortikale Zellneubildung beeinflussen.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde kortikale Zellneubildung bei Tieren, die entweder einer reizreichen Umgebung ausgesetzt oder körperlich aktiv waren, gemessen und mit der kortikalen Zellneubildung bei einer Kontrollgruppe verglichen.

In einer ersten experimentellen Gruppe von C57/BL6 Mäusen, die unter standardisierten Laborbedingungen gehalten wurden, wurde die Basisrate kortikaler Zellproliferation und Zellneubildung gemessen. Dabei wurde die kortikale Zellproliferation in Abhängigkeit von der kortikalen Lokalisation (verschiedene Regionen, verschiedene Schichten) untersucht. Um das phänotypische Schicksal proliferierender kortikaler Zellen verfolgen zu

können, wurde eine Gruppe kurz nach der Markierung sich teilender Zellen, die andere 4 Wochen später untersucht.

In einem zweiten Experiment ging es darum, mögliche physiologische Regulatoren kortikaler Zellproliferation, -überlebens und -differenzierung zu studieren. Da körperliche Aktivität (RUN) und eine reizreiche Umgebung (ENR) deutliche Effekte auf die zelluläre Neogenese im Hippokampus haben, war es von besonderem Interesse, zu prüfen, ob es sich dabei um einen lokal begrenzten Effekt handelt oder weitere Teile des Gehirns betroffen sind.

Dies ist die erste systematische, stereologische Untersuchung adulter kortikaler Zellproliferation und -neubildung. Ziel war es deswegen auch, sehr ausgedehnte Teile des Cortex zu untersuchen, um damit eine solide Ausgangsbasis für detailliertere Analysen in nachfolgenden Studien zu schaffen.

Perspektivisch bieten Einblicke in die Regulation adult kortikalen Zell-Turnovers einmal die Möglichkeit, zu einem Verständnis des kortikalen regenerativen Potentials zu gelangen, zum anderen –möglicherweise- mehr von den Mechanismen funktioneller Plastizität im adulten ZNS zu verstehen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Verwendet wurden 48 weibliche C57/BL6 Mäuse, die von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen worden waren. Das Alter der Mäuse betrug zu Beginn des Experiments 10 Wochen.

2.2 Versuchsaufbau und –bedingungen

2.2.1 Allgemeine Tierhaltungsbedingungen

Alle Mäuse waren für die gesamte Dauer des Experiments im selben Raum untergebracht und bekamen Wasser und Nahrung ad libitum. Der Raum war abgedunkelt, die Hellphase mit künstlicher Beleuchtung währte von 6-18 Uhr, die Dunkelphase von 18-6 Uhr. Die Tierkäfige wurden wöchentlich mit Haushaltsreiniger und klarem Wasser gesäubert und der Streu ausgetauscht.

2.2.2 Experimentelles Design

Zu Beginn des Experiments (Tag 1) wurden die Mäuse zufällig einer der verschiedenen Haltungsbedingungen zugeteilt: je 16 wurden den drei experimentellen Bedingungen (siehe 2.3.3 ff.) ausgesetzt. 8 Mäuse jeder Gruppe lebten 40 Tage unter den jeweiligen Bedingungen und wurden am 41.Tag getötet, 8 Mäuse wurden nach 68 tägiger Exposition am 69. Tag perfundiert. Alle Mäuse erhielten BrdU einmal täglich von Tag 31 bis Tag 40.

2.2.3 Bedingungen einer reizreichen Lebensumwelt (ENR)

Alle 16 ENR Mäuse wurden in einem relativ geräumigen, eigens angefertigten Tierkäfig mit einer Grundfläche von 80 cm x 80 cm (Werkstatt des MDC, Hr. Kagelmaker, MDC) gemeinsam gehalten (Kempermann, Kuhn, and Gage, 1997). Kunststoffröhren wurden nach gründlicher Reinigung zu einem Tunnelsystem in drei Dimensionen zusammengefügt und zum Verbleib im Tierkäfig platziert. Die räumliche Konfiguration des Systems wurde 2-3 mal wöchentlich durch Umstecken der Kunststoffröhren nach deren Säuberung variiert. Metallbestandteile eines gewöhnlichen Tierkafigs bzw. eines Laufradkafigs wurden so in den ENR-Tierkäfig eingebracht, das die Mäuse sie zum Klettern verwenden konnten. Handelsübliche Papierhandtücher, die die Tiere zum Nestbau benutzten, wurden 2-3 mal wöchentlich in den ENR-Käfig gelegt und die alten entfernt. Die Mäuse reagierten auf die Umgestaltung im allgemeinen für eine kurze Zeitdauer mit einer deutlichen Steigerung ihrer explorativen Aktivität, während sie sich in der Zwischenzeit der Hellphasen vor allem in Nestern und im Tunnelsystem aufhielten. Die Pflege und Ernährung der ENR Mäuse unterschied sich nicht von der der anderen Gruppen.

2.2.4 Standardlaborbedingungen (CTR)

Die 16 CTR Mäuse waren jeweils zu viert in Standardtierkäfigen, die nur Streu und den üblichen Träger für Futter und Wasser enthielten, untergebracht. Die Gruppenzusammensetzung wurde konstant gehalten, es fand kein Austausch zwischen den vier CTR-Tierkäfigen statt.

2.2.5 Bedingungen körperlicher Aktivität (RUN)

RUN-Mäuse lebten von Tag 1 bis Tag 30 unter den gleichen Bedingungen wie CTR-Mäuse. Am Tag 31 wurden die RUN-Tierkäfige mit je einem Laufrad ausgestattet, die bis zur Tötung der Mäuse (Tag 41 bzw. 69) dort belassen wurden. RUN-Mäuse hatten während dieser Zeit unbegrenzten Zugang zum Laufrad, von dem sie heftig, vor allem während der Dunkelphase, Gebrauch machten.



Abb. 1 und Abb. 2: Bedingungen einer reizreichen Lebensumgebung (Enriched Environment, ENR)



Abb. 3: Standardlaborbedingungen (Kontrollbedingungen, CTR)



Abb. 4: Bedingungen körperlicher Aktivität (RUN)

2.2.6 BrdU

2.2.6.1 Allgemeines

2-Bromo-5-desoxyuridin (=BrdU, Sigma, Deisenhofen), ein Analogon des Thymidin, wird während der S-Phase des Zellzyklus in die zelluläre DNA integriert. BrdU kann mit Antikörpern immunhistochemisch im Zellkern nachgewiesen werden. Da BrdU eine kurze Bioverfügbarkeit hat, kann retrospektiv die Aussage gemacht werden, daß sich eine Zelle, die BrdU enthält, zu dem Zeitpunkt als BrdU exogen appliziert worden war, geteilt haben muß (Kuhn et al., 1996; Nowakowski et al., 1989).

2.2.6.2 Dosierung

Zur Untersuchung adulter Neurogenese im Gyrus dentatus hippocampi wurden zunächst Dosen von 50µg BrdU/g Körpergewicht, 7-12 mal an aufeinanderfolgenden Tagen injiziert, verwendet. Cameron und McKay schlugen 2001 vor, dass diese Dosis zu niedrig sei, um alle sich teilenden Zellen im erwachsenen Gyrus dentatus der Ratte zu markieren, und man dieses Phänomen mit der niedrigen Dosierung folglich quantitativ unterschätze (Cameron and McKay, 2001). Nach einer einmaligen Injektion von 250 µg BrdU/g KG konnten sie ohne toxische Effekte zu beobachten mehr hippokampale, BrdU positive Zellen finden, als nach mehrfacher Injektion von 50 µg/g KG.

Um die günstigere Dosierung unter unseren Bedingungen zu finden, wurde dem Experiment eine Dosisstudie vorgeschaltet.

Dabei wurde die Anzahl BrdU positiver Zellen in der Granulär- (GZ) und der Subgranulärzone (SGZ) des rechten Hippokampus von 30 C57/BL6 Mäusen untersucht. Je 6 Mäuse erhielten entweder 50 µg BrdU/g KG 1 oder 5 mal oder 250µg BrdU/g KG 1 oder 5 mal. Die Hälfte jeder Gruppe wurde ein Tag nach der (letzten) BrdU-Injektion, die andere Hälfte 4 Wochen nach der (letzten) BrdU-Injektion getötet. Um mögliche Interferenzen von RUN mit der Dosisabhängigkeit der Anzahl BrdU positiver Zellen zu erkennen, wurden Hoch- und Niedrigdosis (einmalige Applikation) bei RUN Mäusen verglichen. Tabelle 1 und Tabelle 2 zeigen, dass nach mehrfacher Gabe der Niedrigdosis (50 µg BrdU/g KG) sowohl 1 Tag als auch 4 Wochen nach der (letzten) BrdU-

Injektion deutlich mehr (Unterschiede signifikant) BrdU positive Zellen in der GZ und SGZ detektierbar sind als nach einmaliger Gabe der Hochdosis (250 µg BrdU/g KG).

Tab. 1: Anzahl BrdU+ Zellen in der GZ und SGZ des eines Hippokampus 1 Tag nach der (letzten) BrdU-Injektion.

Gruppe	1 Injektion	5 Injektionen	RUN, 1 Injektion
Hochdosis (250µg/g KG)	804	1896	972
	1290	1554	1068
	906	2706	1242
Niedrigdosis (250µg/g KG)	1008	3384	1302
	1452	3246	1260
	--	2880	--

Tab. 2: Anzahl BrdU+ Zellen in der GZ und SGZ eines Hippokampus 28 Tage nach der (letzten) BrdU-Injektion.

Gruppe	1 Injektion	5 Injektionen
Hochdosis (250µg/g KG)	336	492
	210	630
	66	534
Niedrigdosis (250µg/g KG)	204	624
	192	732
	144	684

Deswegen entschieden wir uns für die Verwendung des Protokolls der multiplen Injektionen der niedrigen Dosis, mit dem man offensichtlich unter unseren Bedingungen effizienter proliferierende Zellen detektieren kann. Zwar reduzieren die mehrfachen täglichen BrdU-Injektionen die zeitliche Auflösung und erschweren die Beurteilbarkeit der Entwicklung BrdU+ Zellen, da man immer BrdU+ Zellen verschiedenen Alters untersucht. Doch erschien es für die Beurteilung insbesondere kortikaler Zellproliferation unerlässlich, ein Injektionsprotokoll zu verwenden, dass möglichst viele BrdU+ Zellen zur Darstellung bringt, da verlässliche Aussagen über kortikale Zellproliferation und –neubildung aufgrund einer zu geringen Anzahl BrdU+ kortikaler Zellen sonst möglicherweise nicht zu machen gewesen wären.

2.2.6.3 Applikation

BrdU wurde bei -20°C gelagert und am Morgen der Injektion frisch in 0,9% NaCl Lösung gelöst (Konzentration: 20 mg BrdU/ml). Jede Maus wurde gewogen und dann das Injektionsvolumen errechnet. Die BrdU-Lösung wurde konstant gegen 10 Uhr morgens in die Peritonealhöhle der Mäuse injiziert. Die korrekte Platzierung der Kanülenspitze wurde durch Aspiration vor dem Spritzen geprüft.

2.3 Gewebepräparation

2.3.1 Narkose

Die Mäuse wurden durch Perfusion in tiefer Narkose nach einer intraperitoneal applizierten Überdosis des Injektionsnarkotikums Ketamin getötet.

2.3.2 Perfusion

Zur Beseitigung des in zentralnervösen Gefäßen befindlichen Blutes (stört bei der Fluoreszenzmikroskopie) und Fixation des Gewebes wurde der große Kreislauf der Mäuse mit frisch hergestelltem 4% Paraformaldehyd in kaltem 0,1M Phosphatpuffer gespült.

Dazu wurden die Mäuse zunächst sternotomiert und der linke Ventrikel des Herzens mit einer Kanüle punktiert. Über ein angehängtes Infusionsbesteck wurden mit Hilfe einer Pumpe zunächst physiologische Kochsalzlösung und dann 100ml der Paraformaldehydlösung durch den Kreislauf gespült.

2.3.3 Extraktion des Gehirns

Im Anschluß an die Perfusion wurden die Mäuse dekapitiert. Der Schädelknochen wurde durchschnitten und das komplette Gehirn aus der Schädelhöhle gehoben.

2.3.4 Postfixation, Sucrose

Die Gehirne wurden bei 4°C für 24 Std. in 4% Paraformaldehyd in 0,1M Phosphatpuffer fixiert. Anschließend wurden die Hirne in eine 30% Sucrose-Lösung überführt, um dem Gewebe osmotisch Wasser zu entziehen und eine weitgehende Zerstörung der Zellen beim Einfrieren zu verhindern (Inkubation für 72 Std. bei 4°C).

2.3.5 Anfertigung von Schnittserien der Gehirne

Durch einen medianen Sagittalschnitt wurden zunächst die rechte und linke Großhirnhemisphäre getrennt. Auf einem mit Trockeneis gekühlten Kupferblock wurden an einem Schlittenmikrotom (Leica) von der rechten Hemisphäre eine horizontale, von der linken eine koronare Schnittserie erstellt. Die Schnittdicke betrug 40µm.

2.3.6 Lagerung der Hirnschnitte

Die Schnitte wurden bis zur Weiterverwendung bei -20°C in einer Kälteschutzlösung mit 25% Glycerin und 25% Ethylenglykol in Phosphatpuffer (v/v) gelagert.

2.4 Immunhistochemie

2.4.1 Vorbehandlung

Zunächst wurden die Schnitte für zweimal 5 Minuten in TRIS-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) gewaschen. Die immunhistochemische Detektion von BrdU erfordert eine Vorbehandlung, durch die die DNA denaturiert und eine Bindung zwischen anti-BrdU-Antikörpern und in die DNA integriertem BrdU ermöglicht wird. Dies kann durch dreißigminütige Inkubation des Gewebes bei 37°C in 2N HCl erreicht werden. Es folgten zwei Waschschrte, erst ein zehnminütiger in 0,1M Boratpuffer (pH 8,5, Raumtemperatur), dann ein sechzigminütiger in TBS, das etwa alle 5 Minuten ausgetauscht wurde.

2.4.2 Immunhistochemie

Um eine Bindung zwischen Antikörpern und intrazellulär lokalisierten Antigenen zu ermöglichen, müssen trennende lipophile Membranen zerstört werden, wozu Detergenzien wie Triton X-100 Verwendung finden.

Um unspezifische Antikörperbindungen abzusättigen und damit den unspezifischen Hintergrund einer immunhistochemischen Färbung zu reduzieren, kann das Gewebe mit Serum der Spezies, aus der der Sekundärantikörper gewonnen wurde, hier vom Esel, vorbehandelt werden. Aus diesen Gründen ging der Antikörperinkubation eine 30minütige Inkubation des Gewebes in TBS-plus (bestehend aus 96 vol% TBS, 1 vol% Triton X-100 10% und 3 vol% Eselserum) voraus.

Zur Antigendetektion wurden spezifische Antikörper gegen die weiter unten (2.4.3) beschriebenen Antigene (Primärantikörper) verwendet. Die Antikörper wurden in TBS-plus verdünnt und das Gewebe wurde in dieser Lösung bei 4°C für 48 Std. unter ständigem Schütteln inkubiert.

Um eine Visualisierung der Antigen-Primärantikörper-Komplexe zu ermöglichen, wurden diese mit Antikörpern, die an verschiedene Fluoreszenzmoleküle gekoppelt sind und das Fc-Fragment der Primärantikörper erkennen, markiert. Durch diesen Schritt erfolgt außerdem eine Potenzierung der Anzahl der Antikörper, die direkt oder indirekt in Verbindung mit dem Antigen stehen (im Gegensatz zur Verwendung markierter Primärantikörper) und damit eine Verstärkung des Signals.

Nach der Auswaschung nicht spezifisch gebundener Primärantikörper mit TBS (2-mal 15 Minuten) und der Absättigung unspezifischer Bindungsplätze mit TBS-plus (30 Minuten Inkubation), wurde das Gewebe in Sekundärantikörper-TBS-plus-Lösung überführt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 4 Stunden. Nicht spezifisch gebundene Sekundärantikörper wurden mit TBS ausgewaschen (8-mal 5 Minuten). Das Gewebe wurde in 0,1M Phosphatpuffer überführt, auf beschichtete Objektträger aufgezogen und luftgetrocknet. Um ein frühzeitiges Ausbleichen der Fluoreszenzmoleküle zu verhindern wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit PVA-DABCO (10% Polyvinylalkohol und 25% Glycerin in TBS mit 2,5% Diazabicyclo-Oktan) überschichtet, abschließend mit einem Deckglas versehen.

2.4.3 Antikörper

Alle Antikörper wurden in TBS-plus verdünnt verwendet.

2.4.3.1 Primärantikörper

Zur spezifischen Bindung von *BrdU* wurde ein monoklonaler Antikörper aus der Ratte in einer Verdünnung von 1:500 verwendet (Harlan Seralab, Leicestershire, England).

NeuN (Neuronal Nuclei) ist ein neuronales Protein in nukleärer Lokalisation und gilt als spezifischer Marker reifer Nervenzellen (Mullen et al., 1992). Es wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen NeuN (Chemicon, Hofheim, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:100 benutzt.

S100β, ein Calcium-bindendes Protein mit trophischen Eigenschaften, gilt als Marker für einen astrozytären Phänotyp (Ghandour et al., 1981). Es wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen S100β der Firma Swant (Bellinzona, Schweiz) verwendet.

Der polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen *Iba1* - ein mikrogliales Calcium-bindendes Adapterprotein (Ito et al., 1998) - wurde uns großzügigerweise von Dr. Y. Imai und Dr. S. Kohsaka (beide National Institute of Neuroscience, Tokyo, Japan) zur Verfügung gestellt. Er wurde in einer Verdünnung von 1:70 verwendet.

CNP ist eine Phosphodiesterase und gilt als Marker für einen oligodendroglialen Phänotyp (Sheedlo and Sprinkle, 1983). Es wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen CNP in einer Verdünnung von 1:50 verwendet (Abcam, Cambridge, England).

Gegen *NG2* wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Chemicon, Hofheim, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:250 verwendet. NG2 ist ein transmembranös lokalisiertes Proteoglykan und wird von glialen Zellen exprimiert, die in der Lage sind, Oligodendrozyten hervorzubringen (Nishiyama, 2001; Dawson et al., 2000; Stallcup, 1981).

2.4.3.2 Sekundärantikörper

Die alle in einer Verdünnung von 1:250 verwendeten Sekundärantikörper wurden von Jackson Laboratories (Vertrieb: Dianova, Hamburg) bezogen. Benutzt wurden Antikörper aus dem Esel, die entweder gegen das Fc-Fragment von Antikörpern aus der Ratte, der Maus oder dem Kaninchen gerichtet und entweder mit FITC, Rhodamine-X oder CY-5 konjugiert sind.

2.5 Quantifizierung BrdU+ Zellen

Die Quantifizierung der BrdU positiven Zellen erfolgte an einer koronaren Schnittserie der linken Hemisphäre, die die gesamte fronto-okzipitale Ausdehnung der Hemisphäre umfasste. Das Gewebe war immunhistochemisch gegen BrdU und NeuN behandelt worden. Die Quantifizierung erfolgte an einem Leica DM-RXE Mikroskop, das mit dem halbautomatischen stereologischen Analysesystem Stereoinvestigator (MicroBrightfield, Magdeburg) ausgerüstet war.

Der Cortex wurde nach histoarchitektonischen Merkmalen in verschiedene Regionen unterteilt. Es wurden der frontale, cinguläre motorische, somatosensorische, insuläre und visuelle Cortex ausgewertet. Die genannten kortikalen Regionen wurden zur Datenerhebung weiter in bestimmte Schichten gegliedert.

Es wurden frontale Cortexgebiete, die den frontalen Assoziationscortex und den orbitalen Cortex umfassten, zum „frontalen Cortex“ zusammengefasst. Als subkortikaler Orientierungspunkt bei der Abgrenzung des frontalen Cortex nach okzipital hin diente die Körnerzellschicht des Bulbus olfactorius.

Der cinguläre Cortex wurde nach lateral hin vom motorischen Cortex durch eine Linie, die von der Mantelkante bis zum Cingulum reichte, abgegrenzt.

Der motorische Cortex unterschied sich vom lateral benachbart liegenden somatosensorischen Cortex durch die fehlende, prominente innere Körnerzellschicht (Schicht IV). Unter Verwendung desselben Kriteriums (prominente Schicht IV) konnte der somatosensorische Cortex nach lateral vom insulären Cortex differenziert werden.

Der insuläre Cortex konnte nach lateral hin wiederum vom piriformen Cortex unterschieden werden. Als Abgrenzungskriterium diente dabei die prominente äußere Körnerzellschicht (Schicht II) des piriformen Cortex.

Der visuelle Cortex konnte nach medial wie nach lateral durch seine besonders ausgeprägte innere Körnerzellschicht (Schicht IV) abgegrenzt werden. Zur okzipitalen Abgrenzung des somatosensorischen vom visuellen Cortex dienten einerseits subkortikale Orientierungspunkte, andererseits die Orientierung am Übergang cingulärer Cortex (rostral) in den retrosplenialen Cortex (okzipital). Innerhalb der genannten Regionen wurden verschiedene Schicht unterschieden. Bei kräftiger Ausprägung der inneren Körnerzellschicht (Schicht IV) konnten die Schichten II-VI gut in Schicht II/III, Schicht IV und Schichten V+VI differenziert werden (so wurde mit dem visuellen und somatosensorischen Cortex verfahren). In allen anderen erwähnten kortikalen Regionen wurden nur die Schicht I und die zusammengefassten Schichten II-VI getrennt betrachtet. Als Hilfsmittel diente der Atlas des Gehirns der C57Bl/6-Maus der Mouse Brain Library (Rosen, Williams et al., 2000).

Die Anzahl BrdU positiver Zellen in den kortikalen Regionen und Schichten wurde durch Auszählen von 40 µm dicken Schnitten, die 240µm voneinander entfernt waren, bestimmt. Um die Zellzahl der kompletten Struktur zu erhalten, wurden diese Ergebnisse mit sechs multipliziert.

Das gleiche Vorgehen wurde auch auf den Gyrus dentatus des Hippokampus angewandt. Dabei sollte geprüft werden, ob die bekannten Effekte von ENR und RUN auf adulte hippokampale Zellproliferation und –überleben unter unseren Bedingungen replizierbar waren (interne Kontrolle der Wirkung von RUN und ENR auf das Gehirn).

Das Volumen der kortikalen Schichten und Regionen wurde aus den an den Schnitten gemessenen flächenhaften Ausdehnungen der einzelnen Regionen nach dem Cavalieri Prinzip mit Hilfe der StereoInvestigator-Software errechnet.

Angegeben wurde die Anzahl BrdU positiver Zellen in genannten kortikalen Strukturen sowie in allen ausgewerteten kortikalen Teilen zusammen, außerdem die Volumina der Strukturen und, aus beiden Werten errechnet, die Dichte BrdU positiver Zellen.



Abb. 5: Koronarer Schnitt durch das Gehirn einer C57/BL6-Maus. Türkis umrandet: Frontaler Cortex (Schicht I und Schichten II-VI).

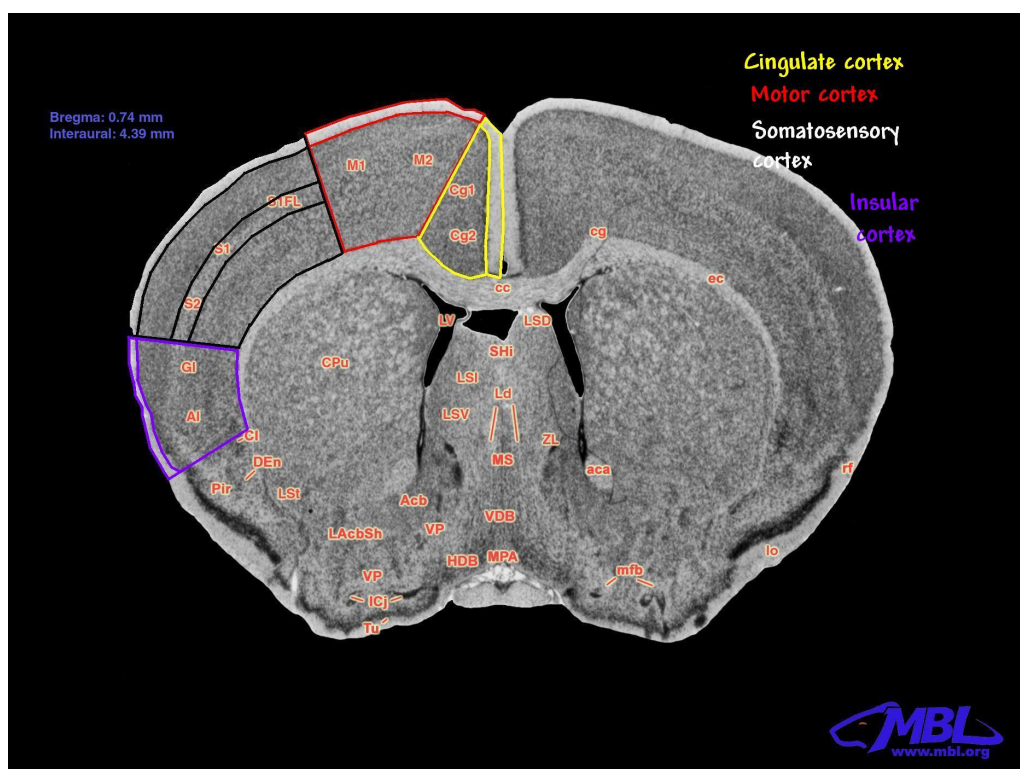


Abb. 6: Koronarer Schnitt durch das Gehirn einer C57/BL6-Maus. Gelb: cingulärer Cortex (Schicht I, Schichten II-VI), rot: motorischer Cortex (Schicht I und Schichten II-VI), schwarz: somatosensorischer Cortex (Schicht I, Schichten II/III, Schicht IV, Schichten V+VI), violett: insulärer Cortex (Schicht I, Schichten II-VI).

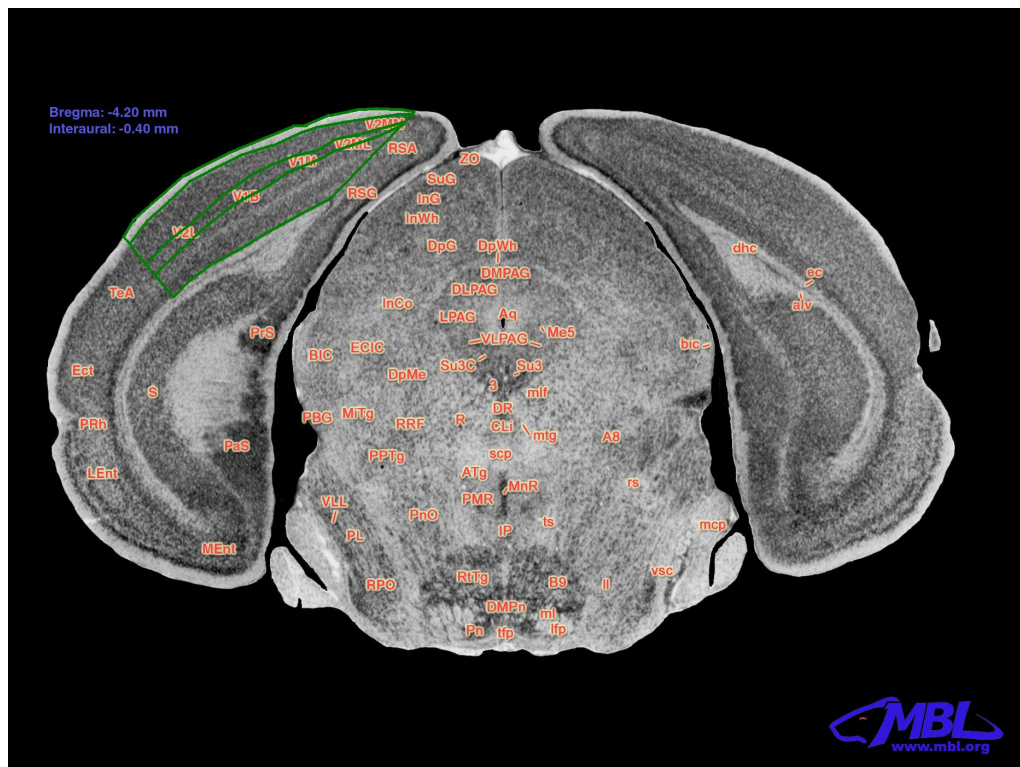


Abb. 7: Koronarer Schnitt durch das Gehirn einer C57/BL6-Maus. Grün umrandet: Visueller Cortex (Schicht I und Schichten II/III, Schicht IV, Schichten V+VI).

2.6 Phänotypisierung BrdU+ Zellen

Um die Phänotypen BrdU+ Zellen zu bestimmen, wurden Gewebeschnitte verwendet, die immunhistochemisch gegen BrdU und verschiedene andere Antigene (vgl. Kapitel 2.4.3), deren spezifische Expression durch bestimmte Zelltypen bekannt ist, behandelt worden waren. Durch Bestimmung der Kolo-kalisation von BrdU-Immunreaktivität und Immunreaktivität gegen andere Antigene konnte der Immunphänotyp BrdU+ Zellen determiniert werden. Dies ist in der Regel mit konventioneller Mikroskopie nicht möglich, da die fokussierte Ebene zu dick ist, um eine Zuordnung optischer Signale zu einer Zelle zu erlauben. Abhilfe schafft hier die konfokale Mikroskopie, mit der eine Untersuchung optischer Schnitte bis zu einer Dicke von nur einem μm möglich ist. Die konfokale Mikroskopie wurde an einem spektralen Leica TCS-SP2 durchgeführt.

Aufgrund der Integration von BrdU in die DNA ist die BrdU-Immunreaktivität nukleär lokalisiert. Um eine mögliche, durch Phagozytose bedingte lysosomale Lokalisation von BrdU in Mikrogliazellen auszuschließen, wurde die

Kolokalisation von BrdU mit dem nukleären Marker TO-PRO-3 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) gezeigt (siehe Abb.8). Die Feststellung der Kolokalisation von BrdU mit anderen Antigenen ist bei ebenfalls nukleärer Lokalisation (dies trifft für NeuN, S100 β und Iba1 zu) einfacher. Bei nicht nukleärer Lokalisation des Antigens (CNP, NG2) ist die Feststellung einer Kolokalisation mit nukleärer BrdU-Immunreaktivität aufwendiger.

2.6.1 Quantitative Phänotypisierung

Zur Phänotypisierung BrdU positiver Zellen wurden koronare Schnittserien der linken Hemisphäre verwendet, deren Schnitte 40 μ m dick und 480 μ m voneinander entfernt waren und die gesamte fronto-okzipitale Ausdehnung der Hemisphäre umfassten. Eine erste Schnittserie wurde immunhistochemisch gegen BrdU, NeuN und S100 β , eine zweite gegen BrdU, NeuN und Iba1, eine dritte gegen BrdU, S100 β und CNP und eine vierte gegen BrdU, NeuN und NG2 behandelt. In die quantitative Phänotypisierung wurden nur die kortikalen Regionen und Schichten eingeschlossen, die signifikante Unterschiede zwischen ENR, RUN und CTR auf Ebene der Anzahl oder Dichte BrdU positiver Zellen hatten erkennen lassen. Fünfzig zufällig ausgewählte und über die gesamte Struktur verteilte, BrdU positive Zellen pro kortikaler Region bzw. Schicht wurden mittels konfokaler Mikroskopie auf Kolokalisation mit anderen immunhistochemischen Markern (NeuN, S100 β , CNP, Iba1, NG2) untersucht. Der Anteil doppelt positiver (z.B. BrdU und S100 β) an allen BrdU positiven Zellen pro Struktur wurde angegeben. Durch Multiplikation mit der absoluten Zahl der BrdU positiven Zellen pro Struktur wurde die absolute Zahl BrdU positiver Zellen mit einem bestimmten Phänotyp erhalten.

2.6.2 Qualitative Phänotypisierung

Zur Beantwortung der Frage, ob im Cortex neugebildete, BrdU-positive Nervenzellen zu finden sind, wurden auch die nicht in die oben beschriebene quantitative Phänotypisierung eingeschlossenen kortikalen Strukturen qualitativ durch ein Screening über den gesamten Cortex hinweg miterfasst. Dabei wurden tausende zufällig ausgewählte und über den gesamten Cortex verteilter, BrdU positive Zellen in den Gehirnen sowohl von ENR-, CTR-, als

auch RUN-Mäusen auf Koloalisation mit NeuN untersucht. Das gleiche Verfahren wurde in geringerem Umfang (mehrere hundert Zellen) für S100 β , Iba1, CNP und NG2 durchgeführt.

2.7 Statistik

Die Statistische Auswertung wurde mit SPSS Version 11.0 und mit Statview 4.5.1. für Macintosh durchgeführt. Für alle Vergleiche wurde ANOVA und, wo nach dem Ergebniss der ANOVA zulässig, Fisher Posthoc-Tests verwendet.

2.8 Methodenkritik

2.8.1 Präparations- und Abgrenzungsprobleme

Die Abgrenzung frontaler Cortexgebiete rostral vom motorischen Cortex okzipital auf der Basis histoarchitektonischer Merkmale war problematisch. Daher dienten in diesem Fall vor allem subkortikale Strukturen (Körnerzellschicht des Bulbus olfactorius) der Orientierung. Bei nicht exakt koronarer Schnittführung kann es mit diesem Verfahren allerdings zu Fehlbeurteilungen kommen. Diese fallen wegen des ohnehin relativ geringen Volumens des frontalen Cortex vergleichsweise stark ins Gewicht. Wohl darauf ist die relativ starke Schwankung des Volumens des frontalen Cortex (siehe Kapitel 3.2.1.1.1, 3.2.2.1.1, 3.2.2.2.1) zurückzuführen.

Ähnliche Schwierigkeiten traten bei der Abgrenzung des visuellen Cortex nach rostral hin auf. Hier half ebenfalls die Orientierung an subkortikalen Strukturen (Körnerzellschicht des Gyrus dentatus). Wegen des Schnittverfahrens blieb der visuelle Cortex nicht komplett erhalten, so dass die am weitesten okzipital gelegenen Gebiete nicht mit in die Auswertung eingingen. Der Anteil am gesamten visuellen Cortex war jedoch gering.

Aufgrund des relativ geringen Volumens des insulären Cortex fielen Inkonsistenzen bei dessen Abgrenzung von benachbarten kortikalen Bereichen hier auch vergleichsweise stark ins Gewicht, was an einer relativ hohen Variabilität des Volumens erkennbar ist.

2.8.2 BrdU als Proliferationsmarker

BrdU-Immunreaktivität zeigt stattgefunden DNA-Synthese an. DNA-Synthese findet nicht nur in der S-Phase vor einer Zellteilung statt, sondern auch im Rahmen normaler DNA-Umsatzprozesse (DNA-Reparatur). Auch degenerierende Zellen können abortive DNA-Synthese ohne Zellteilung zeigen. Wie an Hepatozyten gezeigt wurde, kann DNA-Synthese auch Ausdruck einer Anpassung an einen höheren metabolischen Bedarf sein (Rakic, 2002).

Deswegen ist der Einwand erhoben worden, daß der Nachweis von BrdU-Immunreaktivität nicht ausreichend valide sei, stattgefunden Zellteilung nachzuweisen.

Es ist allerdings mit einer ganzen Reihe anderer Nachweismethoden von Zellteilung (Mitosefiguren, retrovirale Markierungen, immunhistochemischer Nachweis zellzyklusassoziierter Proteine) in der SVZ und im Hippokampus demonstriert worden, daß BrdU+ Zellen auch andere Zeichen ablaufender oder stattgefundener Zellteilung zeigen. Weiterhin war keine Kolokalisation von BrdU- und TUNEL-Immunreaktivität (Nachweis apoptoseassoziierter Caspasen) zu finden. Auch konnte gezeigt werden, daß Bestrahlung von Zellen, die die Induktion von DNA-Reparatur zur Folge hat, unter Verfügbarkeit von BrdU nicht zu einer Zunahme der Anzahl BrdU-inkorporierender Zellen führt.

Es existieren also starke Hinweise darauf, daß zumindest die Masse der BrdU+ Zellen BrdU zellteilungsassoziiert und nicht etwa im Rahmen von DNA-Reparatur oder abortiver DNA-Synthese bei Degeneration akquiriert, und somit BrdU ein geeigneter Marker zur Untersuchung von Zellproliferation ist (Cooper-Kuhn and Kuhn, 2002).

2.8.3 Phänotypisierung

Die Phänotypisierung BrdU+ Zellen setzt voraus, dass die Kolokalisation der BrdU-Immunreaktivität mit der Immunreaktivität auf andere Antigene exakt festzustellen ist. Dies ist durch die Verwendung von Z-Schnittserien bei der konfokalen Mikroskopie, d.h. die Untersuchung der Kolokalisation von BrdU mit einem anderen Antigen auf vielen verschiedenen Ebenen durch eine Zelle, gut möglich.

Allerdings waren die Fluoreszenzfärbungen gegen verschiedene Antigene von recht unterschiedlicher Qualität. So war der Kontrast zwischen spezifischer Färbung und unspezifischer Hintergrundfärbung bei Verwendung der Antikörper gegen Iba1, NeuN, S100 β sicherlich höher (und damit die Auswertung einfacher) als bei Verwendung der Antikörper gegen CNP und NG2.

3 Ergebnisse

Im ersten Abschnitt dieses Kapitels werden die Ergebnisse der Untersuchung kortikaler Zellneubildung unter Kontrollbedingungen dargelegt. Zunächst wird die Verteilung BrdU+ Zellen in kortikalen Schichten und Arealen 1 Tag und 4 Wochen nach BrdU erläutert. Unmittelbar nachgeordnet werden jeweils die Ergebnisse der Phänotypisierung BrdU+ Zellen präsentiert.

Die folgenden zwei Abschnitte befassen sich der gleichen Systematik folgend mit der Wirkung einer reizreichen Umwelt beziehungsweise körperlicher Aktivität auf kortikale Zellneubildung.

Im abschließenden Abschnitt von Kapitel 3 werden die wesentlichen Züge der Ergebnisse in Form einer Zusammenfassung dargestellt.

3.1 Räumliche Verteilung BrdU-inkorporierender Zellen im cerebralen Cortex (Experiment 1)

3.1.1 Unterschiedliche Dichte BrdU-positiver Zellen in Abhängigkeit von der kortikalen Schicht

BrdU-anreichernde Zellen waren sowohl 1 Tag als auch 4 Wochen nach BrdU schichtabhängig unterschiedlich dicht gelagert.

Schicht I

Die höchste Dichte BrdU+ Zellen fand sich in *Schicht I*, und zwar durchgehend in allen untersuchten Regionen. Je nach Region war die Dichte um 50-90% höher als in den zusammengefassten Schichten II-VI. Auch variierte die Dichte BrdU+ Zellen innerhalb Schicht I in Abhängigkeit von der Region: Im cingulären Cortex (1662 +/- 281,9 BrdU+ Zellen/mm³) und frontalen Cortex (1432 +/- 242,9 BrdU+ Zellen/mm³) waren die BrdU+ Zellen signifikant dichter gelagert als in den weiter lateral oder occipital gelegenen Cortexabschnitten (motorischer Cortex: 1282 +/- 396,6 Zellen/mm³; somatosensorischer Cortex: 1041 +/- 242,2 Zellen/mm³; insulärer Cortex: 1128 +/- 313,7 Zellen/mm³; visueller Cortex: 1110 +/- 339,5 Zellen/mm³).

Was wird aus den BrdU+ Zellen in Schicht I? Nach 4 Wochen hatte sich die Dichte BrdU+ Zellen in Schicht I gegenüber Tag 1 nach BrdU nicht signifikant verändert. Es imponierten zwar je nach Region unterschiedlich ausgeprägte,

aber immer leichte Abnahmen der Dichte der BrdU+ Zellen, die aber wie gesagt nicht signifikant waren. So ähnlich verhielt es sich, wenn man nicht die Entwicklung der *Dichte* BrdU+ Zellen über 4 Wochen, sondern der *absoluten Zahl* betrachtete. Dann ergaben sich sehr gut übereinstimmende Werte für beide Zeitpunkte, was dafür spricht, daß die BrdU+ Zellen in Schicht I des cerebralen Cortex nicht etwa transienter Natur waren, sondern zumindest über den hier untersuchten Zeitraum persistierten. Ausgeschlossen ist allerdings nicht die Möglichkeit, daß sich Zellneubildung und Zelluntergang die Waage hielten (eine BrdU+ Zelle kann sich noch mehrfach teilen, ohne daß das inkorporierte BrdU unter die Nachweisgrenze verdünnt wird), oder auch die Möglichkeit, daß Zelluntergang durch Einwanderung anderer BrdU-markierter Zellen in Schicht I quantitativ ausgeglichen wurde. Nach 4 Wochen hob sich die Dichte BrdU+ Zellen in Schicht I nur noch des cingulären Cortex ($1356 \pm 214,8$ Zellen/mm³) von den anderen Regionen ab (frontal: $1095 \pm 261,5$ Zellen/mm³; motorisch: $1009 \pm 175,7$ Zellen/mm³; somatosensorisch: $952 \pm 339,6$ Zellen/mm³; insulär: $1095 \pm 367,6$ Zellen/mm³; visuell: $1079 \pm 150,3$ Zellen/mm³).

Zusammengefaßt kann also festgestellt werden, daß die Anzahl BrdU+ Zellen in Schicht I des cerebralen Cortex abschnittsweise variierte. Weiter fiel auf, daß sich die Zahl BrdU+ Zellen in Schicht I stabiler über die Zeit verhielt, als dies in tiefer gelegenen kortikalen Schichten (siehe unten) der Fall war.

Phänotypisierung BrdU+ Zellen in Schicht I

BrdU+ Zellen wurden generell nur in den kortikalen Bereichen *quantitativ* phänotypisiert, die Unterschiede auf Ebene der Anzahl BrdU+ Zellen zwischen den experimentellen Gruppen ENR, RUN und CTR zeigten. Die Phänotypisierung BrdU+ Zellen wurde daher nur in Schicht I des cingulären, motorischen und visuellen Cortex *quantitativ* vorgenommen, über andere Bereiche von Schicht I werden *qualitative* Aussagen gemacht.

Die meisten BrdU+ Zellen in Schicht I waren S100 β +. S100 β gilt gemeinhin als Marker eines astrozytären Phänotyps. Auch zeigten viele der BrdU+ Zellen Immunreaktivität für NG2. NG2 wird von unreifen glialen Zellen exprimiert, die als Vorläufer von Oligodendrozyten gelten. Die Koexpression von S100 β und NG2 konnte nicht untersucht werden, da die Primärantikörper gegen

S100 β und NG2 beide im Kaninchen hergestellt worden waren. Es ist aber anzunehmen, dass es eine Zellpopulation gab, die beide Marker exprimierte, da beide von über 50% der BrdU+ Zellen exprimiert wurden.

Eine kleinere Gruppe BrdU+ Zellen war *Ibal*+ (spezifischer Marker von Mikroglia) und zeigte die Morphologie von ramifizierter Mikroglia. Wenige BrdU+ Zellen waren *CNP*+, diese Zellpopulation konnte wegen der sehr geringen Zahl nicht quantifiziert. CNP wird von Oligodendrozyten exprimiert.

Kein eindeutiger Hinweis ergab sich für die Existenz *NeuN*+/BrdU+ Zellen. NeuN gilt als spezifischer Marker reifer Nervenzellen. Allerdings wurden vereinzelt (ca. zehn von mehreren tausend BrdU+ Zellen im gesamten Cortex) *NeuN*+/BrdU+ Zellen mit ausschließlicher Lokalisation in Schicht I des frontalen Cortex beobachtet. In allen Fällen war die Immunreaktivität auf BrdU zweifelhaft und die NeuN-Expression relativ schwach, der Befund sei aufgrund seiner lokalisatorischen Spezifität hier trotzdem erwähnt.

Die Anzahl *S100 β* +/BrdU+ Zellen blieb ebenso wie die Anzahl *NG2*+/BrdU+ Zellen über 4 Wochen eher stabil. Zumindest ergab der statistische Vergleich der 1-Tag-nach-BrdU- und 4-Wochen-nach-BrdU-Werte keinen signifikanten Unterschied, wenn auch die Durchschnittswerte über 4 Wochen leicht abzunehmen schienen (signifikant nur im motorischen Cortex I).

Dagegen nahm die Anzahl *S100 β* -/BrdU+ Zellen über 4 Wochen zu (der Mittelwert um etwa 100% im motorischen und visuellen Cortex I). Die Population der *S100 β* -/BrdU+ Zellen entsprach wohl weitgehend der *Ibal*+/BrdU+, die im Zeitverlauf ebenso expandierte (signifikant im cingulären und motorischen Cortex I, nicht signifikant im visuellen Cortex I).

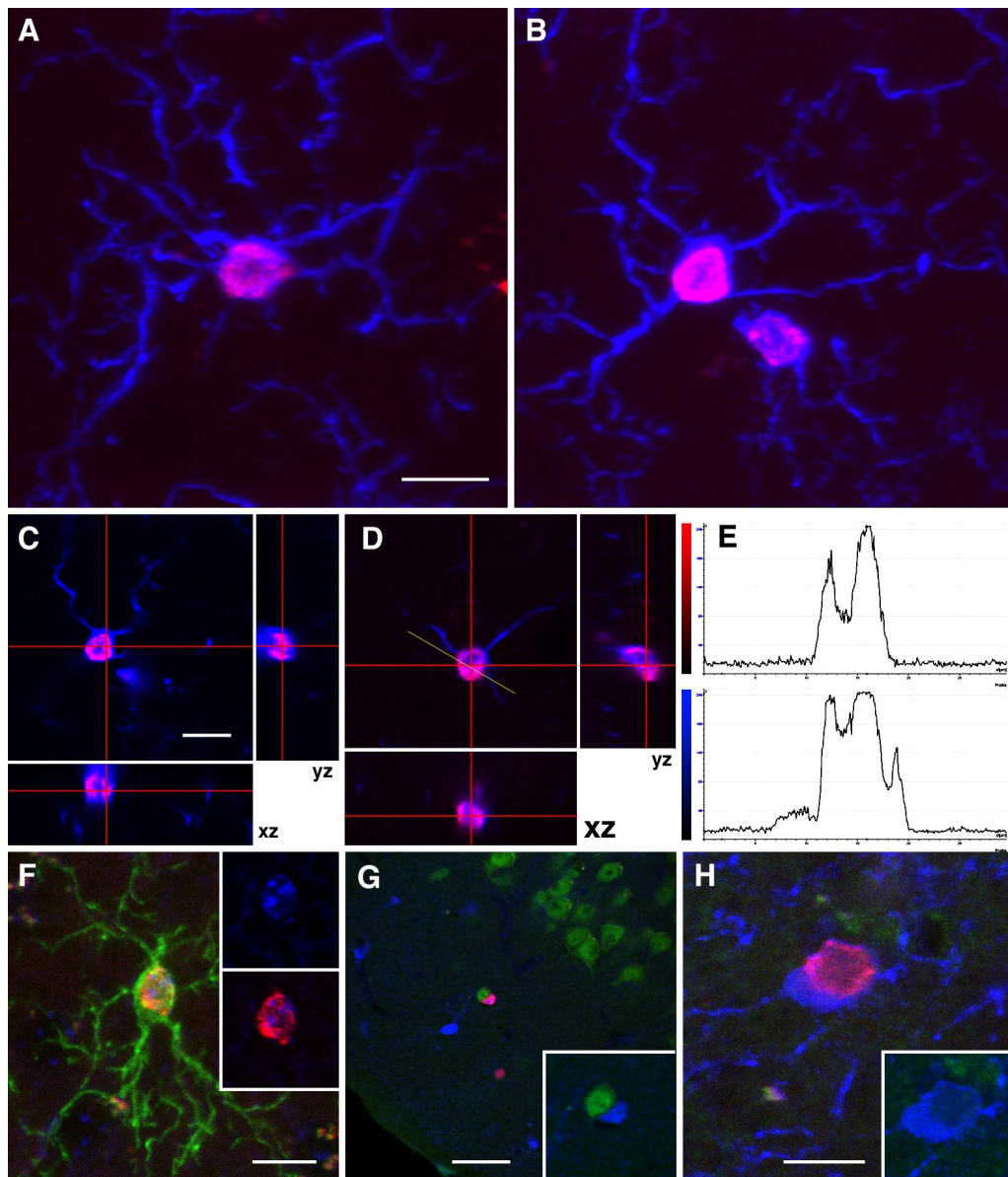


Abb. 8: Phänotypisierung BrdU+ Zellen mittels konfokaler Mikroskopie. A-E: Immunreaktivität gegen Iba1 (blau) und BrdU (rot). A,B: optischer Schnitt durch Iba1+/BrdU+ Zellen. C,D: Schnittserien durch Iba1+/BrdU+ Zellen zeigen, dass sich die BrdU-immunreaktive Struktur in allen Ebenen innerhalb der Iba1-immunreaktiven befindet. E: Die Messung der Signalintensitäten entlang des Linie in D objektiviert die Kolo-kalisation der BrdU- und Iba1-Immunreaktivität. F: Immunreaktivität gegen Iba1 (grün) und BrdU (rot), Kernfärbung mit TO-PRO3 (blau). Man erkennt die nukleäre Lokalisation der BrdU-Immunreaktivität. G: Immunreaktivität gegen S100β (blau), NeuN (grün) und BrdU (rot). Der optische Schnitt zeigt eine S100β+/BrdU+ Zelle in perineuraler Lokalisation. H: Immunreaktivität gegen CNP (blau) und BrdU (rot). Die BrdU-Immunreaktivität (nukleär) ist von der gegen CNP (zytoplasmatisch) umgeben.

Tab. 3: Quantitative Phänotypisierung BrdU+ Zellen im cingulären, motorischen und visuellen Cortex, jeweils Schicht I, 1 Tag und 4 Wochen nach BrdU bei CTR-Tieren.

Phänotyp	Zeitpunkt nach BrdU	Cing Cx I	Mot Cx I	Vis Cx I
S100β+/BrdU+	1 Tag	557 +/- 94,3	941 +/- 393,5	474 +/- 189,3
	4 Wochen	536 +/- 70,7	673 +/- 157,5*	443 +/- 67,0
S100β-/BrdU+	1 Tag	96 +/- 80,0	173 +/- 73,9	65 +/- 39,4
	4 Wochen	115 +/- 59,7	321 +/- 130,1*	119 +/- 58,7
Iba1+/BrdU+	1 Tag	70 +/- 29,5	170 +/- 71,8	50 +/- 27,1
	4 Wochen	223 +/- 69,9*	335 +/- 132,4*	79 +/- 25,1

* signifikanter Unterschied zwischen 1-Tag- und 4-Wochen-nach-BrdU-Werten

Schicht II/III

Die Dichte BrdU+ Zellen in Schicht II/III war 1 Tag nach BrdU deutlich niedriger als in Schicht I und Schichten V+VI, höher dagegen als in Schicht IV (diese Aussagen gelten nur für den visuellen und somatosensorischen Cortex, da nur hier eine Quantifizierung von Schicht II/III vorgenommen wurde). Regionale Unterschiede waren deutlich ausgebildet: Schicht II/III enthielt im visuellen Cortex 749 Zellen/mm³ (+/- 156,6), im somatosensorischen Cortex 539 Zellen/mm³ (+/- 117,5). 4 Wochen später war die Dichte BrdU+ Zellen wie auch die absolute Zahl BrdU+ Zellen in Schicht II/III um etwa 20% abgesunken. Allerdings konnte hier kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten für 1 Tag und 4 Wochen nach BrdU ermittelt werden, so daß es unsicher bleibt, ob die Zahl und Dichte BrdU+ Zellen in Schicht II/III im Zeitverlauf tatsächlich abnahmen.

Phänotypisierung BrdU+ Zellen in Schicht II/III

BrdU+ Zellen aus Schicht II/III wurden ausschließlich im visuellen Cortex quantitativ phänotypisiert. Die Mehrzahl der BrdU+ Zellen im visuellen Cortex II/III war positiv für S100β. Weniger BrdU+ Zellen in Schicht II/III zeigten Immunreaktivität für Iba1 als in Schicht I. CNP+/BrdU+ Zellen fanden sich vereinzelt, wurden aber nicht quantifiziert.

Der Vergleich der jeweiligen Populationen 1 Tag und 4 Wochen nach BrdU erbrachte keinen signifikanten Unterschied. Allerdings zeichnete sich hier, wie auch schon in verschiedenen Bereichen von Schicht I, tendenziell eine Abnahme der S100 β +/BrdU+ und eine Zunahme der S100 β -/BrdU+ Zellen über 4 Wochen ab.

Tab. 4: Quantitative Phänotypisierung BrdU+ Zellen in Schicht II/III des visuellen Cortex 1 Tag und 4 Wochen nach BrdU bei CTR-Tieren.

Phänotyp	Zeitpunkt nach BrdU	Vis Cx II/III
S100 β +/BrdU+	1 Tag	605 +/- 209,0
	4 Wochen	478 +/- 132,4
S100 β -/BrdU+	1 Tag	41 +/- 44,1
	4 Wochen	80 +/- 84,6
Iba1+/BrdU+	1 Tag	23 +/- 21,8
	4 Wochen	25 +/- 22,0

Schicht IV

Schicht IV war von allen untersuchten Schichten diejenige mit der geringsten Dichte BrdU+ Zellen. Da eine unproblematische Abgrenzung von Schicht IV ausschließlich im somatosensorischen und visuellen Cortex möglich war, wurde nur in diesen Regionen die Quantifizierung BrdU+ Zellen speziell in Schicht IV vorgenommen. In den übrigen kortikalen Regionen wurden die Schichten II-VI zusammengefasst quantifiziert.

Im somatosensorischen Cortex war die Dichte BrdU+ Zellen noch geringer als im visuellen Cortex (somatosensorischer Cortex: 1 Tag nach BrdU 458 +/- 135,2 Zellen/mm³; 4 Wochen nach BrdU: 272 +/- 94,5 Zellen/mm³. Visueller Cortex: 1 Tag nach BrdU: 637 +/- 142,7 Zellen/mm³; 4 Wochen nach BrdU: 503 +/- 157,0 Zellen/mm³). Die Dichte BrdU+ Zellen nahm in Schicht IV über 4 Wochen um 20% (visueller Cortex) bzw. 40% (somatosensorischer Cortex) ab (der Unterschied zwischen 1-Tag-nach-BrdU- und 4-Wochen-nach-BrdU-Dichtewert war nicht signifikant). Für die absolute Zahl BrdU+ Zellen konnte bezüglich Schicht IV ein Abfall um 40-50% im Verlaufe der 4 Wochen ermittelt werden (Unterschied signifikant). Die Anzahl BrdU+ Zellen in Schicht IV nahm also innerhalb eines relativ kurzen Zeitraumes ab.

Schicht V und VI

In Schicht V+VI war die Dichte BrdU+ Zellen 1 Tag und 4 Wochen nach BrdU höher als in Schicht II/III und Schicht IV, aber niedriger als in Schicht I. Die absolute Zahl BrdU+ Zellen (wie auch die Dichte) fiel über 4 Wochen um etwa 30-35% (signifikant). Wir hatten es also auch hier mit einem Verlust BrdU+ Zellen über die Zeit zu tun.

Zusammenfassung

Die Dichte BrdU+ Zellen sowohl 1 Tag als auch 4 Wochen nach BrdU war schichtabhängig unterschiedlich ausgeprägt: höchste Werte fanden sich in Schicht I, es folgten die Schichten V+VI, dann kam Schicht II/III; die geringste Dichte BrdU+ Zellen fand sich in Schicht IV. Viele der BrdU+ Zellen in Schicht IV-VI 1 Tag nach BrdU waren 4 Wochen nach BrdU verschwunden, während in Schicht I noch genauso viele wie 1 Tag nach BrdU zu finden waren. Schicht II/III verlor wohl auch einige der BrdU+ Zellen über die Zeit, wenn auch nicht so viele wie Schicht V+VI und sich auch keine signifikante Abnahme zeigen ließ.

Die Phänotypisierung BrdU+ Zellen wurde ausschließlich in den Schichten I-III durchgeführt, so dass keine quantitativen Aussagen über die Schichten IV-VI getroffen werden kann.

Die quantitative Phänotypisierung ergab, dass ein Großteil der BrdU+ Zellen in Schicht I-III S100 β + und/oder NG2+ waren. Diese Zellpopulation(en) zeigte(n) eine leichte Abnahme über 4 Wochen, die aber meist nicht signifikant war. Die restlichen BrdU+ Zellen, also diejenigen, die nicht positiv für S100 β waren, fanden sich häufiger in Schicht I als in Schicht II/III und nahmen tendenziell an Zahl im Verlauf der 4 Wochen zu. Sie entsprachen wohl zum großen Teil Iba1+ Zellen. CNP+/BrdU+ Zellen kamen vereinzelt vor, wurden jedoch nicht quantifiziert.

3.1.2 Die Dichte BrdU-positiver Zellen variierte nur geringfügig in Abhängigkeit von der kortikalen Region

3.1.2.1 Dichte BrdU+ Zellen in Abhängigkeit von der kortikalen Region 1 Tag nach BrdU

Die BrdU inkorporierenden Zellen waren in den meisten kortikalen Regionen eher gleichmäßig verteilt. Allerdings fanden sich auch kortikale Regionen die bezüglich der Dichte BrdU+ Zellen signifikant von anderen kortikalen Bereichen abwichen. Die größte Dichte BrdU+ Zellen beobachtete man im cingulären Cortex ($1195 \pm 198,5$ Zellen/mm³; signifikanter Unterschied zu allen anderen Regionen). Am dünnsten waren die BrdU anreichernden Zellen im somatosensorischen Cortex gestreut ($676 \pm 160,6$ Zellen/mm³; signifikanter Unterschied zu allen anderen Regionen). Die Dichte BrdU+ Zellen in den übrigen untersuchten kortikalen Regionen unterschied sich eher geringfügig voneinander, jedenfalls war keiner der Unterschiede signifikant (Frontaler Cortex: $1008 \pm 88,0$ Zellen/mm³; visueller Cortex: $929 \pm 150,8$ Zellen/mm³; insulärer Cortex: $894 \pm 184,8$ Zellen/mm³; motorischer Cortex: $890 \pm 184,1$ Zellen/mm³)

3.1.2.2 Dichte BrdU+ Zellen in Abhängigkeit von der kortikalen Region 4 Wochen nach BrdU

4 Wochen nach BrdU fand sich die geringste Dichte BrdU+ Zellen wie auch schon 1 Tag nach BrdU im somatosensorischen Cortex ($499 \pm 161,8$ Zellen/mm³; Unterschied zu allen anderen Regionen außer zum motorischen Cortex signifikant). Relativ dünn waren die BrdU+ Zellen auch im motorischen Cortex gesät ($599 \pm 123,0$ Zellen/mm³; Unterschied zu den anderen Regionen außer zum visuellen und somatosensorischen Cortex signifikant). Die Dichte BrdU+ Zellen nach 4 Wochen in den übrigen Regionen unterschieden sich statistisch nicht voneinander (Insulärer Cortex: $802 \pm 153,0$ Zellen/mm³; frontaler Cortex $800 \pm 118,7$ Zellen/mm³; cingulärer Cortex $767 \pm 121,4$ Zellen/mm³; visueller Cortex: $717 \pm 121,9$ Zellen/mm³).

3.1.2.3 Veränderung der Dichte BrdU+ Zellen zwischen 1 Tag nach BrdU und 4 Wochen nach BrdU

Im folgenden ist die Abnahme der Dichte BrdU+ Zellen wie auch die absolute Abnahme der BrdU+ Zellen im Verlaufe von 4 Wochen für die einzelnen Regionen tabellarisch aufgeführt.

Tab. 5: Veränderung der Anzahl und Dichte BrdU+ Zellen über 4 Wochen bezogen auf den 1 Tag nach BrdU Wert (in %) bei CTR-Tieren.

Kortikaler Abschnitt	Veränderung der <i>Anzahl BrdU+ Zellen</i> über 4 Wochen bezogen auf den 1- Tag- nach-BrdU-Wert (in %)	Veränderung der <i>Dichte</i> <i>BrdU+ Zellen</i> über 4 Wochen bezogen auf den 1-Tag- nach-BrdU-Wert (in %)
Frontaler Cortex	+19,5%	-20,6%
Cingulärer Cortex	-36,1%	-35,9%
Motorischer Cortex	-27,6%	-32,7%
Somatosensorischer Cortex	-30,3%	-26,2%
Insulärer Cortex	-3,6%	-10,2%
Visueller Cortex	-19,4%	-22,8%

Auffällig war der vergleichsweise geringe zeitabhängige Verlust BrdU+ Zellen im insulären Cortex. Die anderen Gebiete bewegten sich größenordnungsmäßig im selben Rahmen. Die scheinbar widersprüchlichen Werte des frontalen Cortex beruhten wohl auf methodisch bedingten Volumenunterschieden zwischen 1-Tag- und 4-Wochen-Gruppe (vgl. Kapitel 2.8.1).

3.1.2.4 Zusammenfassung

Die Dichte BrdU+ Zellen zeigte zum Teil regionale Schwankungen. Die geringste Dichte BrdU+ Zellen fand sich sowohl 1 Tag nach BrdU als auch 4 Wochen nach BrdU im somatosensorischen Cortex. Besonders dichte Lagerung BrdU+ Zellen kam im cingulären Cortex 1 Tag nach BrdU vor. Eventuell weitere vorhandene regionale Unterschiede waren zumindest so klein, daß sie hier nicht nachgewiesen werden konnten.

3.2 Einfluß von körperlicher Aktivität (RUN) und reizreicher Umwelt (ENR) auf BrdU inkorporierende kortikale Zellen

3.2.1 Beinflußt körperliche Aktivität BrdU-inkorporierende kortikale Zellen?

Das folgende Experiment wurde ausgeführt, um zu ermitteln, ob körperliche Aktivität Einfluß auf die Anzahl (bzw. Dichte) BrdU+ Zellen 1 Tag bzw. 4 Wochen nach BrdU im cerebralen Cortex hat. Im folgenden werden die Daten einer Gruppe mit gesteigerter körperlicher Aktivität (RUN) mit denen einer Gruppe, die keinen Zugang zu einem Laufrad hatte (CTR), verglichen.

3.2.1.1 Abhängigkeit der Anzahl und Dichte kortikaler BrdU+ Zellen 1 Tag nach BrdU von körperlicher Aktivität

Die Anzahl BrdU+ Zellen in allen untersuchten kortikalen Regionen zusammengenommen zeigte 1 Tag nach BrdU keinen signifikanten Unterschied zwischen RUN und CTR. Ebenso war die Dichte BrdU+ Zellen über alle Regionen gemittelt 1 Tag nach BrdU nicht signifikant unterschiedlich (RUN: 834 +/- 185,3; CTR: 856 +/- 154,0). Allerdings zeigte der Vergleich der Anzahl BrdU+ Zellen zwischen RUN und CTR in einzelnen kortikalen Bereichen signifikante Unterschiede.

Tab. 6: Anzahl BrdU+ Zellen in verschiedenen Bereichen des cerebralen Cortex 1 Tag nach BrdU. Vergleich von RUN und CTR.

Kortikaler Abschnitt	CTR	RUN
Cortex gesamt	17735 +/- 4421,8	18120 +/- 3510,5
Frontaler Cortex I	492 +/- 182,7	566 +/- 128,4
Frontaler Cortex II-VI*	432 +/- 116,6	712 +/- 253,3
Cingulärer Cortex I*	662 +/- 85,7	895 +/- 87,9
Cingulärer Cortex II-VI	1568 +/- 402,4	1651 +/- 275,2
Motorischer Cortex I	1114 +/- 375,8	1159 +/- 290,6
Motorischer Cortex II-VI	4089 +/- 942,3	3860 +/- 1094,9
Somatosens. Cortex I	725 +/- 195,9	692 +/- 167,4
Somatosens. Cortex II/III	976 +/- 287, 3	928 +/- 232,6
Somatosens. Cortex IV	495 +/- 186,1	432 +/- 147,5
Somatosens. Cortex V+VI	2720 +/- 879,3	2368 +/- 747,3
Insulärer Cortex I	336 +/- 145,7	310 +/- 68,8
Insulärer Cortex II-VI	1000 +/- 301,4	986 +/- 244,2
Visueller Cortex I	538 +/- 225,7	663 +/- 102,1
Visueller Cortex II/III	646 +/- 208,7	789 +/- 157,4
Visueller Cortex IV	336 +/- 124,7	366 +/- 87,6
Visueller Cortex V+VI	1604 +/- 488,6	1743 +/- 288,7

3.2.1.1.1 Frontaler Cortex

In Schicht II-VI des frontalen Cortex fanden sich bei RUN im Mittel etwa 60% mehr BrdU+ Zellen als bei CTR (Unterschied signifikant). Allerdings war das Volumen von Schicht II-VI frontal bei RUN um etwa 50% größer als das der Kontrolltiere. Dies war auf methodische Schwierigkeiten zurückzuführen (vgl. Kapitel 2.8.1).

Der Vergleich der *Dichte* der BrdU+ Zellen in Schicht II-VI des frontalen Cortex ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

3.2.1.1.2 Cingulärer Cortex

Bei Tieren der RUN-Gruppe fanden sich im Mittel 35% mehr BrdU+ Zellen in Schicht I des cingulären Cortex als bei Tieren der CTR-Gruppe (Unterschied signifikant). Dieser Unterschied spiegelte sich auch in der Dichte BrdU+ Zellen wider (RUN: 1352 +/- 242,4 Zellen/mm³; CTR: 1195 +/- 198,5 Zellen/mm³; Unterschied signifikant).

Die zusammengefassten Schichten II-VI des cingulären Cortex zeigten keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Phänotypisierung BrdU+ Zellen im cingulären Cortex I (vgl. Tabelle 7)

Keine der untersuchten BrdU+ Zellen, weder bei RUN noch bei CTR, exprimierte *NeuN*. Kein Unterschied zwischen den Gruppen ergab der Vergleich der Anzahl der *S100β*+/*BrdU*+ Zellen.

Im Gegensatz dazu gab es einen signifikanten Unterschied zwischen RUN und CTR bezüglich der Anzahl der *S100β*-/*BrdU*+ Zellen im cingulären Cortex I: RUN hatten durchschnittlich 3,5mal mehr als CTR. Damit hatten RUN im Mittel 244 *S100β*-/*BrdU*+ Zellen mehr in Schicht I des cingulären Cortex als CTR (und durchschnittlich 233 BrdU+ Zellen mehr). Der Vergleich der Anzahl der *Iba1*+/*BrdU*+ Zellen ergab, dass der Anstieg der BrdU+ Zellen unter RUN im cingulären Cortex I im wesentlichen auf eine Zunahme dieser Zellpopulation zurückzuführen ist. Kein Unterschied ergab der Vergleich der Anzahl *NG2*+/*BrdU*+ Zellen.

Tab. 7: Quantitative Phänotypisierung BrdU+ Zellen im cingulärer Cortex I, 1 Tag nach BrdU. Vergleich von RUN und CTR.

Gruppe	BrdU+*	S100β+/ <i>BrdU</i> +	S100β-/ <i>BrdU</i> +*	Iba1+/ <i>BrdU</i> +*	NG2+/ <i>BrdU</i> +
CTR	662 +/- 85,7	565 +/- 88,7	97 +/- 81,0	70 +/- 29,5	560 +/- 77,1
RUN	895 +/- 87,9	554 +/- 104,5	341 +/- 76,9	372 +/- 112	682 +/- 141,2

3.2.1.1.3 Motorischer Cortex

Weder der Vergleich der Menge BrdU+ Zellen in Schicht I noch in den zusammengefassten Schichten II-VI des motorischen Cortex zeigte 1 Tag nach BrdU einen signifikanten Unterschied zwischen RUN und CTR.

Phänotypisierung BrdU+ Zellen im motorischen Cortex I (vgl. Tabelle 8)

Keine der untersuchten BrdU+ Zellen, weder bei RUN noch bei CTR, exprimierte NeuN.

Die Anzahl *S100β*+/BrdU+ Zellen in Schicht I des motorischen Cortex zeigte 1 Tag nach BrdU keinen signifikanten Unterschied zwischen RUN und CTR.

Tiere der RUN-Gruppe hatten signifikant mehr *S100β*-/BrdU+ und signifikant mehr *Iba1*+/BrdU+ Zellen im motorischen Cortex I als Tiere der CTR-Gruppe.

Tab. 8: Quantitative Phänotypisierung BrdU+ Zellen im motorischen Cortex I, 1 Tag nach BrdU. Vergleich von RUN und CTR.

Gruppe	BrdU+	S100β+/BrdU+	S100β-/BrdU+*	Iba1+/BrdU+*	NG2+/BrdU+
CTR	1114 +/- 375,8	941 +/- 393,5	173 +/- 73,9	170 +/- 71,8	1111 +/- 411,1
RUN	1159 +/- 290,6	762 +/- 202,1	397 +/- 129,5	393 +/- 119,6	834 +/- 245,2

3.2.1.1.4 Visueller Cortex

RUN hatten im Durchschnitt etwas mehr BrdU+ Zellen als CTR (23% mehr in Schicht I, 22% mehr in Schicht II/III), wenn auch keine Signifikanz erreicht wurde (vgl. Tabelle 6).

Phänotypisierung BrdU+ Zellen im visuellen Cortex I (vgl. Tabelle 9)

Es wurden keine *NeuN*+/BrdU+ Zellen beobachtet. Kein signifikanter Unterschied ergab sich bezüglich des Vergleichs der Menge *S100β*+/BrdU+ Zellen 1 Tag nach BrdU im visuellen Cortex I von RUN und CTR.

Im Durchschnitt etwa 90% mehr *S100β*-/BrdU+ Zellen hatten die Tiere der RUN-Gruppe in Schicht I des visuellen Cortex als die Kontrolltiere (Unterschied signifikant).

Auch hier war der auf BrdU-Zellzahl-Ebene beobachtete leichte Unterschied zwischen RUN und CTR auf einen deutlichen Anstieg der *Iba1*+/BrdU+ Zellen unter gesteigerter körperlicher Aktivität zurückzuführen.

Tab. 9: Quantitative Phänotypisierung BrdU+ Zellen im visuellen Cortex I, 1 Tag nach BrdU. Vergleich von RUN und CTR.

Gruppe	BrdU+	S100 β + / BrdU+	S100 β - / BrdU+*	Iba1+ / BrdU+*
CTR	538 +/- 225,7	473 +/- 189,9	65 +/- 38,8	50 +/- 27,1
RUN	663 +/- 102,1	538 +/- 117,5	124 +/- 41,1	163 +/- 64,6

Phänotypisierung BrdU+ Zellen im visuellen Cortex II/III (vgl. Tabelle 10)

Es wurden keine *NeuN*+ / BrdU+ Zellen gesehen. RUN und CTR hatten etwa gleich viele *S100 β* + / BrdU+ Zellen in Schicht II/III des visuellen Cortex. Bei den Tieren der RUN-Gruppe fanden sich in diesem kortikalen Bereich etwa 3-mal mehr *S100 β* - / BrdU+ Zellen als bei den Kontrolltieren (Unterschied signifikant). Dies entsprach wiederum dem Unterschied der bei den *Iba1*+ / BrdU+ Zellen gesehen wurde: RUN hatten 1 Tag nach BrdU durchschnittlich 3,6-mal mehr *Iba1*+ / BrdU+ Zellen im visuellen Cortex II/III als CTR.

Tab. 10: Quantitative Phänotypisierung BrdU+ Zellen im visuellen Cortex II/III, 1 Tag nach BrdU. Vergleich von RUN und CTR.

Gruppe	BrdU+	S100 β + / BrdU+	S100 β - / BrdU+*	Iba1+ / BrdU+*
CTR	646 +/- 208,7	603 +/- 204,4	43 +/- 43,7	23 +/- 21,8
RUN	789 +/- 157,4	659 +/- 133,5	130 +/- 45,8	82 +/- 57,8

3.2.1.2 Abhängigkeit der Anzahl und Dichte kortikaler BrdU+ Zellen 4 Wochen nach BrdU von körperlicher Aktivität

Was wurde nun aus den BrdU+ Zellen? Hatte physische Aktivität Einfluß auf die Entwicklung BrdU+ Zellen? Zur Beantwortung dieser Fragen wurden Anzahl und Dichte BrdU+ Zellen 4 Wochen nach BrdU regional- und schichtabhängig einmal bei Tieren mit gesteigerter körperlicher Aktivität, zum anderen bei Kontrolltieren quantifiziert. Der Vergleich RUN versus CTR ergab folgende Unterschiede:

Tab. 11: Anzahl BrdU+ Zellen in verschiedenen Bereichen des cerebralen Cortex 4 Wochen nach BrdU. Vergleich von RUN und CTR.

Kortikaler Abschnitt	CTR	RUN
Cortex gesamt	14170 +/- 3112,3	13526 +/- 1766,9
Frontaler Cortex I	489 +/- 156,5	503 +/- 88,4
Frontaler Cortex II-VI*	620 +/- 303,7	311 +/- 166,1
Cingulärer Cortex I*	684 +/- 70,5	1119 +/- 80,6
Cingulärer Cortex II-VI	908 +/- 316,8	904 +/- 265,5
Motorischer Cortex I*	994 +/- 202,6	1381 +/- 262,1
Motorischer Cortex II-VI	2780 +/- 592,8	2532 +/- 955,8
Somatosens. Cortex I	692 +/- 236,2	707 +/- 178,8
Somatosens. Cortex II/III	747 +/- 251,7	710 +/- 261,6
Somatosens. Cortex IV	261 +/- 98,6	364 +/- 207,0
Somatosens. Cortex V+VI	1731 +/- 636,5	1320 +/- 378,3
Insulärer Cortex I	376 +/- 132,7	301 +/- 68,8
Insulärer Cortex II-VI*	911 +/- 189,8	675 +/- 133,0
Visueller Cortex I*	562 +/- 105,4	827 +/- 229,2
Visueller Cortex II/III	558 +/- 154,8	711 +/- 172,1
Visueller Cortex IV	193 +/- 61,1	211 +/- 51,9
Visueller Cortex V+VI	1201 +/- 331,0	910 +/- 140,2

Der Vergleich sowohl der Anzahl der BrdU+ Zellen (vgl. Tabelle 11) als auch der Dichte BrdU+ Zellen (RUN: 620 +/- 77,0 BrdU+ Zellen/mm³; CTR: 686 +/- 116,6 BrdU+ Zellen/mm³) in allen untersuchten kortikalen Bereichen 4 Wochen nach BrdU zusammengefasst erbrachte keinen Unterschied zwischen RUN und CTR.

Die signifikanten Unterschiede zwischen CTR und RUN im cingulären, motorischen und visuellen Cortex, jeweils Schicht I, bezüglich der Anzahl der BrdU+ Zellen bestätigte sich beim Vergleich der Dichte der BrdU+ Zellen in diesen kortikalen Bereichen. Dagegen unterschied sich die Dichte BrdU+ Zellen in Schicht II-VI des insulären Cortex bei RUN und CTR nicht. Der Unterschied der auf Ebene der absoluten Zahlen beobachtet wurde, beruhte hier auf Schwankungen des Volumens, die Resultat problematischer Abgrenzung der genannten kortikalen Struktur waren (vgl. Kapitel 2.8.1).

3.2.1.2.1 Cingulärer Cortex

4 Wochen nach BrdU hatten Tiere der RUN-Gruppe wie auch schon 1 Tag nach BrdU signifikant mehr BrdU+ Zellen in Schicht I des cingulären Cortex (Der Durchschnitt der RUN-Gruppe lag 64% über dem der Kontrollgruppe). Die Dichte BrdU+ Zellen war bei RUN im Mittel um 55% höher als bei den Kontrolltieren (Unterschied signifikant).

Die Schichten II-VI zeigte gute Übereinstimmung bezüglich der Zahl der BrdU+ Zellen zwischen den Gruppen.

Phänotypisierung BrdU+ Zellen im cingulären Cortex I (vgl. Tabelle 12)

Keine BrdU+ Zelle kolokalisierte mit *NeuN*. Kein Unterschied ergab der Vergleich der Menge *S100β*+/BrdU+ Zellen zwischen RUN und CTR im cingulären Cortex I. RUN hatten deutlich mehr *S100β*-/BrdU+ und *Iba1*+/BrdU+ Zellen als CTR.

Während die Anzahl der *S100β*-/BrdU+ Zellen bei den Tieren der RUN-Gruppe und den Kontrolltieren über 4 Wochen nur leichte Veränderungen zeigte und dies etwa dem Verhalten der *Iba1*+/BrdU+ Zellen bei RUN entsprach, nahmen die *Iba1*+/BrdU+ Zellen bei CTR im Verlauf stärker an Zahl zu (von 70 +/- 29,5 auf 164 +/- 89,3; Unterschied signifikant).

Tab. 12: Quantitative Phänotypisierung BrdU+ Zellen im cingulären Cortex I, 4 Wochen nach BrdU. Vergleich von RUN und CTR.

Gruppe	BrdU+*	<i>S100β</i> +/BrdU+	<i>S100β</i> -/BrdU+*	<i>Iba1</i> +/BrdU+*
CTR	684 +/- 70,5	536 +/- 70,7	115 +/- 59,7	164 +/- 89,3
RUN	1119 +/- 80,6	627 +/- 89,0	345 +/- 145,9	368 +/- 91,8

3.2.1.2.2 Motorischer Cortex

In Schicht I des motorischen Cortex von Tieren der RUN-Gruppe fanden sich 4 Wochen nach BrdU im Mittel 39% mehr BrdU+ Zellen als bei Kontrolltieren, der Unterschied war signifikant.

Man beobachtete bei RUN eine Zunahme der Anzahl BrdU+ Zellen (nicht signifikant) in Schicht I des motorischen Cortex von 1159 +/- 290,6 1 Tag nach BrdU auf 1385 +/- 262,8 4 Wochen nach BrdU. Eine ähnliche Zunahme

BrdU+ Zellen in Schicht I im Verlaufe der 4 Wochen war bei RUN auch im visuellen Cortex zu sehen (allerdings ist auch sie nicht signifikant). Alle anderen Bereiche von Schicht I, insbesondere auch die von anderen Experimentalgruppen (ENR, Kontrolle), zeigten über die 4 Wochen eher eine Stagnation der Zellzahl, aber keine Zunahme.

Schicht II-VI des motorischen Cortex enthielt bei beiden Gruppen BrdU+ Zellen in mengenmäßig gleicher Größenordnung.

Phänotypisierung BrdU+ Zellen im motorischen Cortex I (vgl. Tabelle 13)

Keine BrdU+ Zelle zeigte Positivität für *NeuN*. Der Vergleich der Anzahl *S100β*+/*BrdU*+ Zellen in Schicht I des motorischen Cortex erbrachte 4 Wochen nach BrdU keinen signifikanten Unterschied zwischen RUN und CTR. Der Vergleich der Anzahl der *S100β*+/*BrdU*+ Zellen 1 Tag nach BrdU mit den entsprechenden Zahlen 4 Wochen nach BrdU (RUN: 1 Tag nach BrdU: 761 +/- 201,3; 4 Wochen nach BrdU: 838 +/- 211,6; CTR: 1 Tag nach BrdU: 939 +/- 393,7; 4 Wochen nach BrdU: 669 +/- 157,5) ergab keinen signifikanten Unterschied, weder bei RUN noch bei CTR.

In Schicht I des motorischen Cortex fanden sich bei RUN 4 Wochen nach BrdU im Mittel 67% mehr *S100β*-/*BrdU*+ Zellen als bei den Kontrolltieren (Unterschied signifikant). 4 Wochen nach BrdU fanden sich bei beiden Gruppen mehr *S100β*-/*BrdU*+ Zellen als 1 Tag nach BrdU (RUN: 1 Tag nach BrdU: 484 +/- 254,9; 4 Wochen nach BrdU: 542 +/- 74,9; kein signifikanter Unterschied; CTR: 1 Tag nach BrdU: 174 +/- 75; 4 Wochen nach BrdU: 325 +/- 49,7; Unterschied signifikant).

Die Zellpopulation der *S100β*-/*BrdU*+ Zellen entsprach wohl weitgehend der der *Iba1*+/*BrdU*+ Zellen. Die Tiere der RUN-Gruppe hatten 4 Wochen nach BrdU im motorischen Cortex I signifikant mehr *Iba1*+/*BrdU*+ Zellen als die der CTR-Gruppe. Die durchschnittliche Anzahl *Iba1*+/*BrdU*+ Zellen in Schicht I des motorischen Cortex nahm bei den RUN-Tieren im Verlauf von 4 Wochen um etwa 70% zu (Unterschied zwischen 1 Tag nach BrdU und 4 Wochen nach BrdU signifikant), bei den Kontrolltieren verdoppelte sie sich knapp (Unterschied zwischen 1 Tag nach BrdU und 4 Wochen nach BrdU signifikant).

Tab. 13: Quantitative Phänotypisierung BrdU+ Zellen im motorischen Cortex I, 4 Wochen nach BrdU. Vergleich von RUN und CTR.

Gruppe	BrdU+*	S100β+/BrdU+	S100β-/BrdU+ *	Iba1+/BrdU+*	NG2+/BrdU+
CTR	993 +/- 202,6	669 +/- 157,7	325 +/- 49,7	335 +/- 132,4	804 +/- 185,3
RUN	1381 +/- 262,1	878 +/- 209,7	542 +/- 74,9	670 +/- 147,1	974 +/- 313,1

3.2.1.2.3 Visueller Cortex

In *Schicht I* des visuellen Cortex fanden sich bei RUN 4 Wochen nach BrdU signifikant mehr BrdU+ Zellen als bei CTR (im Mittel 47% mehr). Der visuelle Cortex ließ zusätzlich weitere Unterschiede erkennen: *Schicht II/III* enthielt ebenso wie Schicht I bei Tieren der RUN-Gruppe mehr BrdU+ Zellen als bei den Kontrolltieren (27%, nicht signifikant), in *Schicht V und VI* waren weniger BrdU+ Zellen anzutreffen (24%, nicht signifikant). Gegen die Vermutung, daß die beschriebenen Unterschiede zwischen RUN und CTR, nämlich eine Zunahme der Menge BrdU+ Zellen in den oberen Schichten und eine Abnahme in den unteren Schichten des visuellen Cortex unter gesteigerter körperlicher Aktivität, durch Zellmigration in Richtung Cortexoberfläche bedingt waren, spricht, daß die Anzahl BrdU+ Zellen in Schicht I-III unter gesteigerter körperlicher Aktivität auch schon 1 Tag nach BrdU höher lag als bei den Kontrolltieren, zu einem Zeitpunkt also, wo sich die Menge BrdU+ Zellen in Schicht V+ VI bei beiden Gruppen nicht unterschied.

Phänotypisierung BrdU+ Zellen im visuellen Cortex I (vgl. Tabelle 14)

Keine der BrdU+ Zellen exprimierte *NeuN*. Der Vergleich der Anzahl *S100β*+/BrdU+ Zellen in Schicht I des visuellen Cortex erbrachte 4 Wochen nach BrdU keinen signifikanten Unterschied zwischen RUN und CTR. Die mittlere Anzahl *S100β*+/BrdU+ Zellen blieb über 4 Wochen bei beiden Gruppen relativ konstant: Während die Tiere der RUN-Gruppe 1 Tag nach BrdU im visuellen Cortex I 538 +/- 117,5 *S100β*+/BrdU+ Zellen hatten, waren es 4 Wochen nach BrdU 561 +/- 144,8 (kein signifikanter Unterschied). Ähnliche Verhältnisse fanden sich bei den Kontrolltieren: 1 Tag nach BrdU 473 +/- 189,9 *S100β*+/BrdU+ Zellen, 4 Wochen nach BrdU 441 +/- 65,9 (kein signifikanter Unterschied).

Tiere der RUN-Gruppe hatten 2,2 mal so viele *S100 β -BrdU+* Zellen in Schicht I des visuellen Cortex wie Kontrolltiere (Unterschied signifikant). Die Anzahl der *S100 β -BrdU+* Zellen verdoppelte sich bei beiden Gruppen über 4 Wochen etwa (RUN: 1 Tag nach BrdU: 124 +/- 41,1; 4 Wochen nach BrdU: 267 +/- 143,5; Unterschied signifikant; CTR: 1 Tag nach BrdU: 65 +/- 38,8; 4 Wochen nach BrdU: 121 +/- 58,7; Unterschied nicht signifikant). Ähnlich stellten sich die Ergebnisse der Phänotypisierung der *Iba1*-immunreaktiven Schnittserie dar: RUN hatten 4 Wochen nach BrdU signifikant mehr *Iba1+/BrdU+* Zellen im visuellen Cortex I als CTR. Das entsprach einer durchschnittlichen Zunahme der *Iba1+/BrdU+* Zellen über 4 Wochen bei RUN um über 90% (Unterschied signifikant) und bei CTR um knapp 60% (Unterschied nicht signifikant).

Tab. 14: Quantitative Phänotypisierung BrdU+ Zellen im visuellen Cortex I, 4 Wochen nach BrdU. Vergleich von RUN und CTR.

Gruppe	BrdU+*	S100 β +/BrdU+	S100 β -/BrdU+ *	Iba1+/BrdU+*	NG2+/BrdU+
CTR	562 +/- 105,4	441 +/- 65,9	124 +/- 41,1	79 +/- 25,1	475 +/- 142,8
RUN	827 +/- 229,2	561 +/- 144,8	267 +/- 143,5	314 +/- 203,5	600 +/- 99,3

Phänotypisierung der BrdU+ Zellen im visuellen Cortex II/III (vgl. Tabelle 15)

Es wurden keine NeuN+/BrdU+ Zellen beobachtet. Der Vergleich der Anzahl *S100 β +/BrdU+* Zellen in Schicht I des visuellen Cortex erbrachte 4 Wochen nach BrdU keinen signifikanten Unterschied zwischen RUN und CTR. Vier Wochen nach BrdU fanden sich bei beiden Gruppen etwas weniger *S100 β +/BrdU+* Zellen als 1 Tag nach BrdU, bei den Runnern 32%, bei den Kontrolltieren 21% weniger (RUN: 1 Tag nach BrdU: 659 +/- 133,5; 4 Wochen nach BrdU: 445 +/- 88,5; Unterschied signifikant; CTR: 1 Tag nach BrdU: 603 +/- 207,4; 4 Wochen nach BrdU: 477 +/- 131,7; Unterschied nicht signifikant).

Die Anzahl der *S100 β -/BrdU+* Zellen war bei den Tieren der RUN-Gruppe etwa 3-fach höher als bei den Kontrolltieren (Unterschied signifikant). Sowohl bei RUN als auch bei CTR war der 4-Wochen-nach-BrdU-Wert der *S100 β -/BrdU+* Zellen grob etwa doppelt so hoch wie der 1-Tag-nach-BrdU-Wert (RUN: 1 Tag nach BrdU: 130 +/- 45,8; 4 Wochen nach BrdU: 266 +/- 151,8;

Unterschied nicht signifikant; CTR: 1 Tag nach BrdU: 43 +/- 43,7; 4 Wochen nach BrdU: 81 +/- 85,8; Unterschied nicht signifikant).

Tiere der RUN-Gruppe hatten signifikant mehr Iba1+/BrdU+ Zellen als Kontrolltiere.

Tab. 15: Quantitative Phänotypisierung BrdU+ Zellen im visuellen Cortex II/III, 4 Wochen nach BrdU. Vergleich von RUN und CTR.

Gruppe	BrdU+	S100β+/BrdU+	S100β-/BrdU+ *	Iba1+/BrdU+*	NG2+/BrdU+
CTR	558 +/- 154,8	477 +/- 131,7	81 +/- 85,8	25 +/- 22,0	493 +/- 156,9
RUN	711 +/- 172,1	445 +/- 88,4	266 +/- 151,8	114 +/- 66,2	572 +/- 127,9

Die übrigen kortikalen Regionen wurden ebenfalls quantifiziert, zeigten aber ähnliche Werte für Dichte und Anzahl BrdU+ Zellen bei beiden Gruppen (vgl. Tabelle 11).

3.2.1.3 Die Anzahl der BrdU+ Zellen im Gyrus dentatus hippocampi unter körperlicher Aktivität 1 Tag nach BrdU bzw. 4 Wochen nach BrdU

In der Granulär- und Subgranulärzone des Gyrus dentatus hippocampi fanden sich sowohl 1 Tag nach BrdU als auch 4 Wochen nach BrdU bei Tieren der RUN-Gruppe signifikant mehr BrdU+ Zellen als bei den Kontrolltieren. Damit konnte der vorab von van Praag et al. (van Praag et al., 1999) beschriebene Effekt körperlicher Aktivität auf hippocampale BrdU-inkorporierende Zellen repliziert werden (interne Kontrolle der Wirkung von RUN auf das Gehirn).

Tab. 16: Anzahl BrdU+ Zellen 1 Tag und 4 Wochen nach BrdU. In der GZ/SGZ des Gyrus dentatus hippocampi. Vergleich von RUN und CTR.

Gruppe	Zeitpunkt nach BrdU	Anzahl BrdU+ Zellen
CTR	1 Tag	4791 +/- 379,0
	4 Wochen	2221 +/- 1172,3
RUN	1 Tag*	6741 +/- 916,5
	4 Wochen*	4233 +/- 1430,2

3.2.1.4 Zusammenfassung

Im Gegensatz zu robusten, deutlichen und generalisierten Effekten von RUN auf Zellproliferation und –neubildung im Gyrus dentatus hippocampi, die in dieser Studie repliziert werden konnten, waren die Effekte von RUN auf Zellproliferation und –neubildung im cerebralen Cortex nicht auf Anhieb so deutlich erkennbar. Der Vergleich der Anzahl BrdU+ Zellen in allen kortikalen Bereichen zusammengenommen ergab keinen Unterschied zwischen RUN und CTR.

Erst die Analyse einzelner Schichten und Regionen brachte einen Unterschied auf Ebene der Anzahl BrdU+ Zellen zum Vorschein. Die Phänotypisierung der BrdU+ Zellen in diesen Bereichen zeigte, dass RUN einen deutlichen und zelltypspezifischen Einfluß auf bestimmte kortikale Gebiete gehabt hatte. Es konnte in allen phänotypisierten kortikalen Bereichen und zu beiden Zeitpunkten nach BrdU ein signifikanter Anstieg der Menge BrdU+ Mikroglia gegenüber CTR beobachtet werden. Hinzukam, dass sich 4 Wochen nach BrdU mehr Iba1+/BrdU+ Zellen als 1 Tag p.i fanden. Es konnte in den phänotypisierten Gebieten gezeigt werden, dass RUN keinen Effekt auf kortikale Astrozytogenese gehabt hatte. Weiterhin wurde die Anzahl NG2+/BrdU+ Zellen in den untersuchten kortikalen Bereichen nicht durch körperliche Aktivität beeinflusst.

3.2.2 Beeinflußt eine reizreiche Umwelt (ENR) BrdU-inkorporierende kortikale Zellen?

3.2.2.1 Die Anzahl und Dichte kortikaler BrdU+ Zellen unter ENR 1 Tag nach BrdU

Um zu ermitteln, ob die Umweltbedingungen, wie sie unter enriched environment gegeben sind, Einfluß auf die Anzahl und Verteilung BrdU+ Zellen im cerebralen Cortex 1 Tag nach BrdU haben, wurden diese Parameter bei Mäusen bestimmt, die entsprechenden Umweltverhältnissen für 40 Tage ausgesetzt waren, und mit den Werten von Mäusen, die diesen speziellen Verhältnissen nicht ausgesetzt waren, verglichen.

Der Vergleich der Menge BrdU+ Zellen in allen kortikalen Regionen zusammengekommen 1 Tag nach BrdU ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen ENR und CTR (vgl. Tabelle 17), ebensowenig der Vergleich der entsprechenden Dichten (ENR: 920 +/- 95,8 Zellen/mm³; CTR: 856 +/- 154,0 Zellen/mm³).

Allerdings zeigte die regionale Ausprägung der Anzahl BrdU+ Zellen gewisse, wenn auch meist nicht signifikante Unterschiede zwischen ENR und CTR, auf die wir im folgenden zu sprechen kommen wollen.

Tab. 17: Anzahl BrdU+ Zellen in verschiedenen Bereichen des cerebralen Cortex 1 Tag nach BrdU. Vergleich von ENR und CTR.

Kortikaler Abschnitt	CTR	ENR
Cortex gesamt	17735 +/- 4421,8	19358 +/- 2383,3
Frontaler Cortex I	492 +/- 182,7	592 +/- 213,2
Frontaler Cortex II-VI*	432 +/- 116,6	711 +/- 258,6
Cingulärer Cortex I	662 +/- 85,7	773 +/- 82,4
Cingulärer Cortex II-VI	1568 +/- 402,4	1531 +/- 201,8
Motorischer Cortex I	1114 +/- 375,8	1209 +/- 239,0
Motorischer Cortex II-VI	4089 +/- 942,3	4143 +/- 425,6
Somatosens. Cortex I	725 +/- 195,9	872 +/- 249,4
Somatosens. Cortex II/III	976 +/- 287, 3	1087 +/- 251,3
Somatosens. Cortex IV	495 +/- 186,1	516 +/- 173,2
Somatosens. Cortex V+VI	2720 +/- 879,3	2744 +/- 552
Insulärer Cortex I	336 +/- 145,7	361 +/- 111,5
Insulärer Cortex II-VI	1000 +/- 301,4	1038 +/- 77,4
Visueller Cortex I	538 +/- 225,7	653 +/- 125,1
Visueller Cortex II/III	646 +/- 208,7	808 +/- 116,1
Visueller Cortex IV	336 +/- 124,7	369 +/- 103,7
Visueller Cortex V+VI	1604 +/- 488,6	1692 +/- 205,5

3.2.2.1.1 Frontaler Cortex

Während der Vergleich der Anzahl BrdU+ Zellen in *Schicht I* des frontalen Cortex zwischen ENR und CTR keinen Unterschied erbrachte, hatten die Tiere der ENR-Gruppe signifikant mehr BrdU+ Zellen in den zusammengefassten *Schichten II-VI* des frontalen Cortex. Allerdings war das Volumen des frontalen Cortex II-VI der ENR-Tieren durchschnittlich um 45% größer als das der Kontrolltiere. Dieser Unterschied war wohl am ehesten auf Schwierigkeiten bei der Abgrenzung des frontalen Cortex nach okzipital zurückzuführen und zufällig entstanden (vgl. Kapitel 2.8.1.). Diese Volumendifferenz könnte den Großteil der beobachteten Differenz in der Zahl BrdU+ Zellen erklären. Unabhängig vom Volumen ist der Vergleich der Dichte BrdU+ Zellen. ENR-Tiere hatten 867 +/- 126,8 BrdU+ Zellen/mm³ in den zusammengefassten Schichten II-VI des frontalen Cortex gegenüber 760 +/-

73,6 BrdU+ Zellen/mm³ bei den Kontrolltieren (Unterschied nicht signifikant). Somit war kein eindeutiger Unterschied zwischen ENR und CTR im frontalen Cortex festzustellen.

3.2.2.1.2 Cingulärer Cortex

Der cinguläre Cortex *in toto* enthielt bei beiden Gruppen eine ähnliche Menge BrdU+ Zellen. In *Schicht I* des cingulären Cortex aber fanden sich unter ENR bezüglich absoluter Zahl und Dichte (ENR: 1758 +/- 258,7 Zellen/mm³; CTR: 1661 +/- 281,9 Zellen/mm³) etwas mehr BrdU+ Zellen als bei CTR (Unterschiede nicht signifikant).

Phänotypisierung BrdU+ Zellen im cingulären Cortex I (vgl. Tabelle 18)

Bei keiner der beiden Gruppen wurden *NeuN*+/*BrdU*+ Zellen gesehen. Bei ENR fanden sich ca. 20 % mehr *S100β*+/*BrdU*+ Zellen als bei den Kontrolltieren, der Unterschied zu CTR war signifikant. Die Anzahl der *S100β*-/*BrdU*+ Zellen unterschied sich nicht. Ebenso erbrachte der Vergleich der Menge der *Iba1*+/*BrdU*+ Zellen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

Tab. 18: Quantitative Phänotypisierung BrdU+ Zellen im cingulären Cortex I, 1 Tag nach BrdU. Vergleich von ENR und CTR.

Gruppe	BrdU+	S100β+/BrdU+*	S100β-/BrdU+	Iba1+/BrdU+	NG2+/BrdU+
CTR	662 +/- 85,7	565 +/- 88,7	97 +/- 81,0	70 +/- 29,5	596 +/- 166,8
ENR	795 +/- 64,4	684 +/- 43,0	89 +/- 60,3	118 +/- 55,3	663 +/- 67,0

3.2.2.1.3 Visueller Cortex

In den oberen 3 Schichten des visuellen Cortex fanden sich 1 Tag nach BrdU bei ENR mehr BrdU+ Zellen als bei CTR, wenn auch dieser Unterschied zu den Kontrolltieren nicht signifikant war: In Schicht I waren es 21% und in Schicht II/III 25% mehr BrdU+ Zellen unter ENR.

Phänotypisierung BrdU+ Zellen im visuellen Cortex I (vgl. Tabelle 19)

Keine der BrdU+ Zellen war positiv für NeuN. In Schicht I des visuellen Cortex fanden sich bei den ENR-Tieren 19% mehr S100 β +/BrdU+ Zellen als bei den Kontrolltieren (Unterschied nicht signifikant). Kein signifikanter Unterschied ließ sich die Anzahl der S100 β -/BrdU+ Zellen bzw. die Anzahl der Iba1+/BrdU+ betreffend zwischen beiden Gruppen finden.

Tab. 19: Quantitative Phänotypisierung BrdU+ Zellen im visuellen Cortex I, 1 Tag nach BrdU. Vergleich von ENR und CTR.

Gruppe	BrdU+	S100 β + / BrdU+	S100 β - / BrdU+	Iba1+ / BrdU+
CTR	538 +/- 225,7	473 +/- 189,9	65 +/- 38,8	50 +/- 27,1
ENR	653 +/- 125,1	561 +/- 146,6	92 +/- 35,1	65 +/- 36,1

Phänotypisierung BrdU+ Zellen im visuellen Cortex II/III (vgl. Tabelle 19)

Auch hier fand sich keine BrdU+ Zelle, die positiv für NeuN war. Die ENR-Tiere hatten im Mittel 27% mehr S100 β +/BrdU+ Zellen in Schicht II/III des visuellen Cortex als die Kontrolltiere, wenn auch dieser Unterschied nicht signifikant war. Bei beiden Gruppen fand man wenige BrdU+ Zellen, die negativ für S100 β und positiv für Iba1 waren (keine signifikanten Unterschiede zwischen ENR und CTR).

Tab. 20: Quantitative Phänotypisierung BrdU+ Zellen im visuellen Cortex II/III, 1 Tag nach BrdU. Vergleich von ENR und CTR.

Gruppe	BrdU+	S100 β + / BrdU+	S100 β - / BrdU+	Iba1+ / BrdU+
CTR	646 +/- 208,7	603 +/- 204,4	43 +/- 43,7	23 +/- 21,8
ENR	808 +/- 116,1	763 +/- 129	46 +/- 46,9	34 +/- 28,0

3.2.2.1.4 Somatosensorischer Cortex

Kein signifikanter Unterschied ergab sich in dieser Region beim Vergleich der BrdU+ Zellen zwischen ENR und CTR.

Erwähnenswert ist, daß es im somatosensorischen Cortex einen leichten, nicht signifikanten Unterschied zwischen ENR und CTR bezüglich der Anzahl BrdU+ Zellen gab, der ähnlich gelagert war wie im visuellen Cortex (s.o.). Denn auch hier enthielten die oberen 3 Schichten bei den ENR-Tieren mehr

BrdU+ Zellen als bei CTR, wenn dieser Unterschied auch eher geringfügig war, während sich die Menge BrdU+ Zellen in den unteren 3 Schichten stärker ähnelten. Schicht I hatte bei ENR 20% und Schicht II/III 12% mehr BrdU+ Zellen als bei CTR. Aber wie gesagt war keiner der erwähnten Unterschiede zwischen ENR und CTR im somatosensorischen Cortex signifikant.

Die Anzahl BrdU+ Zellen 1 Tag nach BrdU wurde auch in den hier nicht genannten Regionen ermittelt (motorischer und insulärer Cortex). Da kein Unterschied zwischen ENR und CTR zu erkennen war, wird hier auf die weitere Erläuterung verzichtet.

3.2.2.2 Die Anzahl und Dichte kortikaler BrdU+ Zellen unter ENR 4 Wochen nach BrdU

Der Vergleich der Anzahl der kortikalen BrdU+ Zellen 4 Wochen nach BrdU von ENR-Tieren und Kontrolltieren soll beurteilen helfen, ob ENR Einfluß auf die mittelfristige Entwicklung kortikaler BrdU+ Zellen hat.

ENR-Tiere hatten im Mittel 15293 BrdU+ Zellen (\pm 5104,0) in allen untersuchten kortikalen Regionen zusammengekommen, Kontrolltiere 15228 BrdU+ Zellen (\pm 2523). Auf global-kortikaler Ebene zeigte sich also kein Unterschied bezüglich der Anzahl BrdU+ Zellen 4 Wochen nach BrdU.

Einer der untersuchten Cortexabschnitte zeigte 4 Wochen nach BrdU signifikante Unterschiede bezüglich der Anzahl BrdU+ Zellen zwischen den Gruppen (Schicht II/III des visuellen Cortex), einer der untersuchten Bereiche (Schicht II-VI frontaler Cortexabschnitte) zeigte signifikante Veränderungen nur bezüglich der Dichte BrdU+ Zellen, nicht aber bezüglich der absoluten Zahl, die anderen beobachteten Unterschiede waren nicht signifikant, seien aber im einzelnen aufgeführt.

Tab. 21: Anzahl BrdU+ Zellen in verschiedenen Bereichen des cerebralen Cortex 4 Wochen nach BrdU. Vergleich von ENR und CTR.

Kortikaler Abschnitt	CTR	ENR
Cortex gesamt	15228 +/- 2523,0	15293 +/- 5104,0
Frontaler Cortex I	489 +/- 156,5	396 +/- 138,0
Frontaler Cortex II-VI	620 +/- 303,7	405 +/- 195,7
Cingulärer Cortex I	684 +/- 70,5	800 +/- 559,7
Cingulärer Cortex II-VI	908 +/- 316,8	1197 +/- 543,3
Motorischer Cortex I	994 +/- 202,6	1191 +/- 249,8
Motorischer Cortex II-VI	2780 +/- 592,8	2829 +/- 666,2
Somatosens. Cortex I	692 +/- 236,2	836 +/- 237,3
Somatosens. Cortex II/III	747 +/- 251,7	836 +/- 213,8
Somatosens. Cortex IV	261 +/- 98,6	418 +/- 232,5
Somatosens. Cortex V+VI	1731 +/- 636,5	1725 +/- 897,8
Insulärer Cortex I	376 +/- 132,7	375 +/- 83,3
Insulärer Cortex II-VI	911 +/- 189,8	861 +/- 171,7
Visueller Cortex I	562 +/- 105,4	675 +/- 176,5
Visueller Cortex II/III*	558 +/- 154,8	735 +/- 143,4
Visueller Cortex IV	193 +/- 61,1	213 +/- 76,6
Visueller Cortex V+VI	1201 +/- 331,0	989 +/- 363,5

3.2.2.2.1 Frontaler Cortex

In frontalen Cortexbereichen fanden sich 4 Wochen nach BrdU bei ENR-Tieren weniger (nicht signifikant) BrdU+ Zellen (801 +/- 299,1 BrdU+ Zellen) als bei Kontrolltieren (1109 +/- 405,0 BrdU+ Zellen). Auch die *Dichte* BrdU+ Zellen 4 Wochen nach BrdU in diesem Bereich spiegelte diesen Unterschied wider: 698 BrdU+ Zellen/mm³ (+/- 125,8) unter ENR gegenüber 800 BrdU+ Zellen/mm³ (+/- 118,7) bei CTR (Unterschied nicht signifikant).

Interessanterweise hatte dieser Unterschied im frontalen Cortex andere Vorzeichen als 1 Tag nach BrdU. Während 1 Tag nach BrdU mehr BrdU+ Zellen im frontalen Cortex unter ENR zu finden waren, waren es 4 Wochen nach BrdU weniger als bei Kontrolltieren. Die Dichte BrdU+ Zellen in den

frontalen Schichten II-VI fiel bei den ENR-Tieren innerhalb 4 Wochen um knapp 40% ab, bei den Kontrolltieren nur um 14%.

Möglicherweise führte ENR hier zu einer Erhöhung der Zellproliferation, so daß 1 Tag nach BrdU mehr BrdU+ Zellen zu finden waren. Diese BrdU+ Zellen könnten sich nun über 4 Wochen weitergeteilt haben, und zwar so oft, daß die BrdU-Markierung unter die Nachweisgrenze verdünnt wurde, und somit 4 Wochen später weniger BrdU+ Zellen als bei der Kontrollgruppe nachweisbar waren. Oder aber der höhere Abfall der Zellzahl bei ENR-Tieren beruhte auf einer Beschleunigung des Untergangs BrdU+ Zellen durch ENR. Theoretisch denkbar wäre auch, daß eine Beeinflussung des Wanderverhaltens BrdU+ Zellen durch ENR zu dieser Veränderung führte. Dagegen spricht aber, daß bei der Quantifizierung angrenzender Regionen keine entsprechenden Hinweise beobachtet wurden.

3.2.2.2.2 Cingulärer Cortex

Signifikante Abweichungen fielen weder bezüglich der Anzahl noch der Dichte (ENR: 856 +/- 450,1 BrdU+ Zellen/mm³; CTR: 767 +/- 148,6 BrdU+ Zellen/mm³) BrdU+ Zellen im gesamten cingulären Cortex auf. Auch in Schicht I des cingulären Cortex war 4 Wochen nach BrdU kein signifikanter Unterschied zwischen ENR und CTR zu finden. Aufgrund des 1 Tag nach BrdU im cingulären Cortex I zwischen ENR und CTR beobachteten Unterschiedes seien die Befunde dieses kortikalen Bereich hier trotzdem erläutert.

Phänotypisierung BrdU+ Zellen im cingulären Cortex I (vgl. Tabelle 21)

Der Vergleich der verschiedenen Phänotypen BrdU+ Zellen zwischen CTR und ENR 4 Wochen nach BrdU erbrachte keinen signifikanten Unterschied. *1 Tag nach BrdU* hatten ENR im cingulären Cortex I signifikant mehr S100 β +/BrdU+ Zellen als CTR. 4 Wochen nach BrdU fand man bei ENR eher weniger S100 β +/BrdU+ Zellen als bei CTR. Zu möglichen Erklärungen dieser auf den ersten Blick scheinbar widersprüchlichen Daten siehe Abschnitt 3.2.2.2.1.

Tab. 22: Quantitative Phänotypisierung BrdU+ Zellen im cingulären Cortex I, 4 Wochen nach BrdU. Vergleich von ENR und CTR.

Gruppe	BrdU+	S100β+/BrdU+	S100β-/BrdU+	Iba1+/BrdU+	NG2+/BrdU+
CTR	684 +/- 70,5	536 +/- 70,7	115 +/- 59,7	223 +/- 69,9	541 +/- 130,1
ENR	799 +/- 559,7	444 +/- 39,2	73 +/- 41,1	165 +/- 197,9	632 +/- 229,8

3.2.2.2.3 Motorischer Cortex

Tiere der ENR-Gruppe hatten etwa 20% mehr BrdU+ Zellen in Schicht I des motorischen Cortex als Kontrolltiere (Unterschied nicht signifikant). Sehr ähnliche Zahlen für beide Gruppen wurden bezüglich Schicht II-VI ermittelt.

Phänotypisierung BrdU+ Zellen im motorischen Cortex I (vgl. Tabelle 22)

Keine *NeuN*+/*BrdU*+ Zelle wurde gesehen. Bei den ENR-Tieren fanden sich durchschnittlich 38% mehr *S100β*+/*BrdU*+ Zellen als bei den Kontrolltieren (Unterschied signifikant). Während sich die Anzahl der *S100β*+/*BrdU*+ Zellen bei ENR 1 Tag nach BrdU und 4 Wochen nach BrdU in der gleichen Größenordnung bewegte (ENR: 1 Tag nach BrdU: 947 +/- 106,1; 4 Wochen.: 924 +/- 172,3; Unterschied nicht signifikant), fand sich bei den Kontrolltieren eine Abnahme des Durchschnittswertes über 4 Wochen (1 Tag nach BrdU: 939 +/- 393,7; 4 Wochen nach BrdU: 669 +/- 157,5; Unterschied nicht signifikant). Der Vergleich der Anzahl *S100β*-/*BrdU*+ und *Iba1*+/*BrdU*+ Zellen zwischen ENR und CTR erbrachte keinen signifikanten Unterschied. Bei den Kontrolltieren zeigte sich eine signifikante Zunahme der Anzahl der *S100β*-/*BrdU*+ und der *Iba1*+/*BrdU*+ Zellen über 4 Wochen, während diese Zellpopulationen bei den ENR-Tieren im Zeitverlauf nicht expandierten.

Tab. 23: Quantitative Phänotypisierung BrdU+ Zellen im motorischen Cortex I, 4 Wochen nach BrdU. Vergleich von ENR und CTR.

Gruppe	BrdU+	S100β+/BrdU+*	S100β-/BrdU+	Iba1+/BrdU+	NG2+/BrdU+
CTR	993 +/- 202,6	669 +/- 157,5	325 +/- 49,7	335 +/- 132,4	804 +/- 185,3
ENR	1191 +/- 249,8	924 +/- 172,3	266 +/- 189,8	294 +/- 224,0	906 +/- 232,8

3.2.2.2.4 Somatosensorischer Cortex

Wie auch schon 1 Tag nach BrdU fielen 4 Wochen nach BrdU höhere BrdU+ Zellzahlen bei ENR in Schicht I-III des somatosensorischen Cortex auf (Unterschiede zu CTR nicht signifikant). Im somatosensorischen Cortex I fanden sich bei ENR etwa 20%, im somatosensorischen Cortex II/III 10% mehr BrdU+ Zellen als bei CTR.

Zusätzlich zu den unsicheren Unterschieden in Schicht I-III war auch die Anzahl BrdU+ Zellen unter ENR in Schicht IV des somatosensorischen Cortex höher (dieser Unterschied war 1 Tag nach BrdU nicht zu sehen), allerdings nicht signifikant.

3.2.2.2.5 Visueller Cortex

Wie auch schon 1 Tag nach BrdU waren die Schichten I-III des visuellen Cortex bei ENR-Tieren reicher an BrdU+ Zellen. *Schicht I* hatte bei ENR-Tieren durchschnittlich 20% mehr BrdU+ Zellen als bei Kontrolltieren (Unterschied nicht signifikant). *Schicht II/III* enthielt bei ENR-Tieren 32% mehr BrdU+ Zellen als bei CTR (Unterschied signifikant).

In *Schicht IV* des visuellen Cortex waren bei beiden Gruppen gleich viele BrdU+ Zellen zu finden. Die *Schichten V+VI* zeigten mehr BrdU+ Zellen bei den Kontrolltieren (ENR: 989 +/- 363,5 BrdU+ Zellen; Kontrolle: 1201 +/- 331,0 BrdU+ Zellen), der Unterschied war nicht signifikant.

Gegen die Vermutung, daß die beschriebenen Unterschiede zwischen ENR- und Kontrolltieren, nämlich eine Zellzunahme in den oberen Schichten und eine Abnahme in den unteren Schichten unter ENR, durch Zellmigration in Richtung Cortexoberfläche bedingt ist, spricht, daß die Anzahl BrdU+ Zellen in Schicht I-III unter ENR auch schon 1 Tag nach BrdU höher lag als bei den Kontrolltieren, zu einem Zeitpunkt also, wo sich die Anzahl BrdU+ Zellen in Schicht V+ VI bei beiden Gruppen nicht unterschied.

Phänotypisierung BrdU+ Zellen im visuellen Cortex I (vgl. Tabelle 23)

Keine der BrdU+ Zellen war positiv für *NeuN*. Schicht I enthielt bei ENR-Tieren nicht signifikant mehr *S100β*+/BrdU+ Zellen als bei CTR. Die Anzahl *S100β*+/BrdU+ Zellen blieb über 4 Wochen bei beiden Gruppen stabil (ENR: 1

Tag nach BrdU: 561, +/- 146,6; 4 Wochen nach BrdU: 498 +/- 111,0; CTR: 1 Tag nach BrdU: 473 +/- 189,9; 4 Wochen nach BrdU: 441 +/- 65,9).

Der Vergleich der Anzahl der *S100β*+/BrdU+ und der *Iba1*+/BrdU+ Zellen zwischen ENR und CTR erbrachte keinen signifikanten Unterschied. Die Anzahl *S100β*+/BrdU+ und *Iba1*+/BrdU+ Zellen im visuellen Cortex I nahm sowohl bei ENR als auch bei CTR im Zeitverlauf deutlich, aber nicht signifikant zu.

Tab. 24: Quantitative Phänotypisierung BrdU+ Zellen im visuellen Cortex I, 4 Wochen nach BrdU. Vergleich von ENR und CTR.

Gruppe	BrdU+	<i>S100β</i> +/BrdU+	<i>S100β</i> -/BrdU+	<i>Iba1</i> +/BrdU+	NG2+/BrdU+
CTR	562 +/- 105,4	441 +/- 65,9	124 +/- 41,1	79 +/- 25,1	475 +/- 142,8
ENR	675 +/- 176,5	498 +/- 111,0	177 +/- 99,8	136 +/- 86,3	570 +/- 80,1

Phänotypisierung BrdU+ Zellen im visuellen Cortex II/III (vgl. Tabelle 24)

Keine der BrdU+ Zellen war positiv für NeuN. Schicht II/III des visuellen Cortex enthielt bei ENR durchschnittlich 28% mehr *S100β*+/BrdU+ Zellen als bei den Kontrolltieren (Unterschied nicht signifikant). Die durchschnittliche Anzahl an *S100β*+/BrdU+ Zellen erfuhr bei beiden Gruppen über 4 Wochen eine Abnahme (ENR: 1 Tag nach BrdU: 763 +/- 129,0; 4 Wochen nach BrdU: 609 +/- 125,1; Unterschied signifikant; CTR: 1 Tag nach BrdU: 603 +/- 207,4; 4 Wochen nach BrdU: 477 +/- 131,7; Unterschied nicht signifikant).

Schicht II/III des visuellen Cortex enthielt 4 Wochen nach BrdU bei ENR im Mittel 56% mehr *S100β*-/BrdU+ Zellen als bei den Kontrolltieren (Unterschied nicht signifikant). Der Vergleich der Anzahl der *Iba1*+/BrdU+ Zellen im visuellen Cortex II/III erbrachte keinen Unterschied zwischen ENR und CTR. Eine Veränderung der Menge *S100β*-/BrdU+ sowie der *Iba1*+/BrdU+ Zellen im Zeitverlauf war weder bei ENR noch bei CTR zu erkennen.

Tab. 25: Quantitative Phänotypisierung BrdU+ Zellen im visuellen Cortex II/III, 4 Wochen nach BrdU. Vergleich von ENR und CTR.

Gruppe	BrdU+*	<i>S100β</i> +/BrdU+	<i>S100β</i> -/BrdU+	<i>Iba1</i> +/BrdU+	NG2+/BrdU+
CTR	558 +/- 154,8	477 +/- 131,7	81 +/- 85,8	25 +/- 22,0	509 +/- 169,7
ENR	735 +/- 143,5	609 +/- 125,1	126 +/- 42,5	32 +/- 26,5	674 +/- 151,6

Im insulären Cortex wurden keine Veränderungen bezüglich Zellzahl oder – dichte unter den verschiedenen Bedingungen beobachtet.

3.2.2.3 Anzahl BrdU+ Zellen im Gyrus dentatus hippocampi unter ENR 1 Tag p.i bzw. 4 Wochen nach BrdU

In der Granulär- und Subgranulärzone des Gyrus dentatus hippocampi fanden sich 1 Tag nach BrdU bei ENR-Tieren etwas mehr BrdU+ Zellen als bei den Kontrolltieren (Unterschied nicht signifikant). Vier Wochen nach BrdU enthielt der Gyrus dentatus bei ENR-Tieren signifikant mehr BrdU+ Zellen als bei Kontrolltieren. Damit konnte der von Kempermann et al. beschriebene Effekt von ENR auf hippocampale zelluläre Neogenese (Kempermann et al., 1997) repliziert und damit gezeigt werden, dass die in unserem Experiment herrschenden Bedingungen adäquat waren, diesen Effekt auszulösen.

Tab. 26: Anzahl BrdU+ Zellen 1 Tag und 4 Wochen nach BrdU. In der GZ/SGZ des Gyrus dentatus hippocampi. Vergleich von ENR und CTR.

Gruppe	Zeitpunkt nach BrdU	Anzahl BrdU+ Zellen
CTR	1 Tag	4791 +/- 379,0
	4 Wochen	2221 +/- 1172,3
ENR	1 Tag*	5440 +/- 177,0
	4 Wochen*	3392 +/- 1210,0

3.2.2.4 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass ENR keinen generalisierten Effekt auf adulte kortikale Zellproliferation und Zellneubildung hat. Auf Ebene der BrdU+ Zellen war kaum ein Unterschied zwischen ENR und CTR zu erkennen. Geringfügige und meist nicht signifikante Unterschiede zwischen ENR und CTR konnten im frontalen, cingulären (Schicht I), motorischen (Schicht I) und visuellen Cortex (Schicht I-III) beobachtet werden. Die im cingulären Cortex (Schicht I), motorischen Cortex (Schicht I), visuellen Cortex (Schicht I, II/III) durchgeführte Phänotypisierung BrdU+ Zellen ergab, dass ENR hier tendenziell eine Zunahme der S100 β +BrdU+ Zellen bewirkte. Da der Vergleich der S100 β +BrdU+ Zellen zwischen ENR und CTR in den meisten phänotypisierten Gebieten nicht signifikante Unterschiede erbrachte, muß die Schlussfolgerung, dass ENR zu einem Anstieg der Menge der S100 β +BrdU+ Zellen in den genannten kortikalen Bereichen führte, allerdings unsicher bleiben.

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

3.3.1 Welche Zellen werden im adulten murinen cerebralen Cortex neu gebildet?

-Im adulten cerebralen Cortex neugebildete Zellen exprimierten überwiegend S100 β , was einen astrozytären Phänotyp anzeigt.

-Hoch war auch der Anteil NG2+/BrdU+ Zellen an allen BrdU+ Zellen. NG2 gilt als Marker unreifer Gliazellen.

-Es ist davon auszugehen, dass ein Teil der BrdU+ Zellen sowohl S100 β als auch NG2 exprimierte. Dieser Zelltyp könnte einer bestimmten glialen Vorläuferpopulation entsprechen (diskutiert wird diese Interpretation in Kapitel 4.1.1 und Kapitel 4.3).

-Ein nicht geringer Anteil der kortikalen BrdU+ Zellen exprimierte Iba1. Dieser Zelltyp fand sich in Schicht I häufiger als in anderen kortikalen Schichten. Iba1 ist ein spezifischer Marker eines mikroglialen Phänotyps.

-Selten fanden sich CNP+/BrdU+ Zellen (BrdU+ Oligodendrozyten) im cerebralen Cortex.

-Unter tausenden phänotypisierter BrdU+ Zellen ließ sich keine finden, die zweifelsfrei eine Immunreaktivität gegen NeuN (Marker reifer Neurone) zeigte.

3.3.2 Beeinflußt körperliche Aktivität (RUN) kortikale zelluläre Neogenese?

-Die Anzahl BrdU+ Zellen im gesamten cerebralen Cortex zeigte keinen Unterschied zwischen RUN und CTR.

-Einzelne kortikale Bereiche zeigten eine signifikante Zunahme der Anzahl BrdU+ Zellen unter RUN.

-Die Phänotypisierung BrdU+ Zellen in diesen kortikalen Bereichen ergab, dass die signifikanten Unterschiede zwischen RUN und CTR auf eine Zunahme der Anzahl Iba1+/BrdU+ Zellen zurückzuführen war.

-Die Anzahl anderer BrdU+ Zelltypen zeigte in den phänotypisierten Bereichen keinen signifikanten Unterschied zwischen RUN und CTR.

-Daraus folgt, dass RUN zelltypspezifisch in einzelnen kortikalen Bereichen die Neubildung kortikaler Mikroglia verstärkt.

3.3.3 Beeinflußt das Leben in einer reizreichen Umwelt (ENR) kortikale zelluläre Neogenese?

-Die Anzahl BrdU+ Zellen im gesamten Cortex zeigte keinen Unterschied zwischen ENR und CTR.

-Nur in einzelnen kortikalen Bereichen konnten signifikante Unterschiede zwischen ENR und CTR bezüglich der Anzahl BrdU+ Zellen gezeigt werden.

-Die Phänotypisierung BrdU+ Zellen ergab in einzelnen kortikalen Bereichen signifikant mehr S100 β +/BrdU+ Zellen unter ENR. In anderen kortikale Bereichen fanden sich unter ENR tendentiell etwas mehr S100 β +/BrdU+ Zellen, der Unterschied zwischen ENR und CTR war aber nicht signifikant.

-Daraus folgt, dass ENR in einzelnen kortikalen Bereichen adulte Astrozytogenese verstärkt.

4 Diskussion

4.1 Adult kortikal proliferierende Zellen

4.1.1 Adulte kortikale Gliogenese

Im erwachsenen Cortex der Maus neugebildete Zellen waren vor allem Gliazellen, allen voran S100 β exprimierende gliale Zellen.

Astrozyten

Die Expression von S100 β deutet auf einen astrozytären Phänotyp hin. Frühere, autoradiographische Untersuchungen, die lichtmikroskopisch durchgeführt wurden, wiesen bereits auf adulte kortikale Astrozytogenese im Nagerhirn hin (Kraus-Ruppert et al., 1973; Noetzel and Rox, 1964). Allerdings war die lichtmikroskopische Differenzierung der Neuroglia mit Unsicherheiten verbunden. Elektronenmikroskopische, autoradiographische Bestätigung adulter Astrozytogenese im visuellen Cortex der Ratte folgte (Kaplan and Hinds, 1980).

Was wird aus den neugebildeten kortikalen Astrozyten? Wie oben ausgeführt, schien die Anzahl S100 β +/BrdU+ Zellen tendenziell in den quantitativ phänotypisierten kortikalen Bereichen über 4 Wochen eher abzunehmen, wenn auch nicht signifikant.

In kortikalen Bereichen, deren BrdU+ Zellen nicht quantitativ phänotypisiert worden waren, die aber prima vista einen relativ hohen Anteil an S100 β +/BrdU+ Zellen hatten, konnte eine deutliche Abnahme der Anzahl BrdU+ Zellen über 4 Wochen beobachtet werden (z.B. visueller Cortex V+VI). Es ist anzunehmen, dass diese Abnahme der Anzahl BrdU+ Zellen im Zeitverlauf durch eine Abnahme der Anzahl S100 β +/BrdU+ Zellen zumindest mitbedingt war. Es spricht also manches dafür, dass nicht alle kortikalen S100 β +/BrdU+ Zellen persistierten.

Aus Studien am Rattenhirn ist bekannt, dass die Gesamtzahl der kortikalen Astrozyten über 27 Monate nach der Geburt relativ konstant bleibt (Vaughan and Peters, 1974; Ling and Leblond, 1973). Ähnliche Verhältnisse im cerebralen Cortex der Maus vorausgesetzt, ließe auf einen kontinuierlichen

astrozytären Zellverlust, der durch Neubildung von Astrozyten kompensiert wird, schließen. Tatsächlich deutete die erwähnte tendenzielle Abnahme der S100 β +/BrdU+ Zellen über 4 Wochen auf einen astrozytären Zellverlust hin, der zusammen mit der kontinuierlichen Neubildung von Astrozyten (durch Zellteilung, wie hier nachgewiesen, und/oder möglicherweise auch durch Differenzierung präformierter Vorläufer) zur Kompensation der astrozytären Gesamtzahl führen könnte.

Oligodendrozyten

Nicht quantifiziert wurde in dieser Studie die Anzahl der BrdU+ kortikalen Oligodendrozyten. Es wurden jedoch Schnittserien des cerebralen Cortex immunhistochemisch gegen den oligodendroglialen Marker CNP behandelt und qualitativ untersucht. Relativ wenige der kortikalen BrdU+ Zellen exprimierten CNP.

Dies steht scheinbar im Widerspruch zu einigen anderen Studien. Hommes und Leblond benutzten eine Silberfärbung nach Hortega, um ³H-Thymidin-markierte Oligodendrozyten zu identifizieren. Sie vermuteten einen großen Anteil an Oligodendrozyten unter den neugebildeten kortikalen Zellen (Hommes and Leblond, 1967). Kaplan und Hinds charakterisierten ³H-Thymidin-inkorporierende Zellen im visuellen Rattencortex elektronenmikroskopisch. Einige der markierten kortikalen Zellen schienen Oligodendrozyten zu sein (Kaplan and Hinds, 1980).

In diesen Untersuchungen wurden wohl zum Teil andere Zellpopulationen als in dieser Arbeit untersucht. Problematisch erscheint auch der Vergleich einer Phänotypisierung auf morphologischer Basis mit einer immunhistochemischen Phänotypisierung. Die Verwendung konfokaler Mikroskopie zur Phänotypisierung in dieser Arbeit bot natürlich ein höheres Maß an Sicherheit bei der Feststellung einer Kolo-kalisation verschiedener immunhistochemischer Marker als konventionelle mikroskopische Verfahren.

Aus dem Labor von James E. Goldman stammende Befunde wurden als Hinweise auf hauptsächlich stattfindende adulte kortikale Oligodendrozytogenese gewertet (Gensert and Goldman, 2001; Levison, Young, and Goldman, 1999). Allerdings unterschied sich das experimentelle Vorgehen grundsätzlich von dem hier beschriebenen. Es wurde eine in vivo mit

BrdU markierte Zellpopulation extrahiert und in vitro immunphänotypisch charakterisiert (Gensert and Goldman, 2001). Die von den hier beschriebenen Ergebnissen abweichenden Befunde könnten die Folge einer Selektion nur bestimmter BrdU+ Zellen oder eines anderen Verhaltens dieser Zellen in vitro sein. Levison et al. markierten sich in der perinatalen SVZ der Ratte teilende Zellen mit einem retroviralen Vektor und verfolgten das Verhalten der in den Cortex einwandernden markierten Zellen mittels in-vivo-Immunphänotypisierung (Levison and Goldman, 1999). Sie beschrieben eine Expansion oligodendroglialer und als prä-oligodendroglial gewerteter NG2+ Klone, während die Anzahl markierter Astrozyten im Zeitverlauf abnahm. Aus dieser Studie abgeleitete Aussagen können sich natürlich nur auf die perinatal in den Cortex einwandernden Zellpopulationen beziehen.

Die in der Literatur beschriebene Expansion der kortikalen oligodendroglialen Gesamtpopulation (Ling and Leblond, 1973) mit zunehmendem Lebensalter (Ratte) dürfte in Zusammenschau mit der hier beschriebenen (Maus) eher geringfügigen adulten kortikalen Oligodendrozytogenese am besten durch ein geringes Maß an Zellverlust bei langsamer Zellneubildung oder oligodendrogliale Neubildung aus präformierten kortikalen Vorläufern ohne Zellteilung zu erklären sein.

Mikroglia

Iba1+/BrdU+ Zellen zeigten die Morphologie ramifizierter Mikroglia und waren oft in Gruppen gelagert. Die Iba1+/BrdU+ Zellen (BrdU+ Mikroglia) fanden sich besonders häufig in Schicht I des cerebralen Cortex und stellten hier insbesondere bei RUN einen großen Anteil an allen BrdU+ Zellen. Geringer war der Anteil der Iba1+/BrdU+ Zellen (insbesondere unter CTR) an allen BrdU+ Zellen in tieferen kortikalen Schichten. Die nukleäre Lokalisation von BrdU bei Iba1+/BrdU+ Zellen wurde durch die Kolo­kalisierung mit dem Kernmarker TO-PRO-3 bestätigt.

Hommes und Leblond beobachteten unter den von ihnen verwendeten Bedingungen sogar einen Anteil der Mikroglia von 31% an allen sich teilenden kortikalen Zelle der Ratte (Hommes and Leblond, 1967).

Unklar blieb, ob die neugebildeten Mikrogliazellen Abkömmlinge sich lokal teilender Vorläufer oder einwandernder Zellen hämatopoetischer Herkunft

waren. Sowohl eine lokale Proliferation (Eliason et al., 2002; Glenn et al., 1992; Lawson et al., 1992; Alliot et al., 1991) als auch eine Einwanderung aus dem Blut (Priller et al., 2001; Eglitis, 1997; Hickey et al., 1992; Lawson et al., 1992) wären denkbar. Die Beobachtung, dass kortikale Iba1+/BrdU+ Zellen sowohl 1 Tag als auch 4 Wochen nach BrdU häufig in Gruppen gelagert waren, sprach eher für lokale Zellteilung. Hommes und Leblond untersuchten sich teilende kortikale Zellen in stündlichem Abstand 1-12 Stunden nach Applikation des Proliferationsmarkers ^3H -Thymidin (Hommes and Leblond, 1967). Aus Untersuchungen von Königsmark und Sidman (Königsmark and Sidman, 1963) war bekannt, dass erst 11- 12 Stunden nach der Gabe von ^3H -Thymidin markierte Leukozyten im peripheren Blut auftauchen. Hommes und Leblond werteten den fehlenden Anstieg der markierten Mikroglia 12 Stunden nach ^3H -Thymidin-Applikation und das Vorhandensein markierter Mikroglia in der Zeit davor als Hinweis auf *lokale* Neubildung von Mikroglia. Lawson et al. schätzten, dass lokale Proliferation und monozytäre Einwanderung aus dem Blut zu etwa gleichen Teilen zur Neubildung von Mikroglia im Gehirn beitragen (Lawson et al., 1992).

Der mikrogliale Zellumsatz im erwachsenen cerebralen Cortex stellt sich wie folgt dar: die Gesamtzahl kortikaler Mikroglia bleibt zumindest bei der Ratte über das Lebensalter von einem $\frac{3}{4}$ Monat bis zu fünf Monate weitgehend konstant (Ling and Leblond, 1973). Es werden durch Zellproliferation laufend neue Mikrogliazellen hinzugefügt (vgl. Kapitel 3, (Lawson et al., 1992)). Nach Schätzungen von Lawson et al. tragen die in-situ Proliferation und die Einwanderung von Monozyten aus dem Blut zu etwa gleichen Teilen zum steady-state bei. Es wäre daher zu erwarten, dass Mikroglia entsprechend kontinuierlich untergeht.

Gliale Vorläuferzellen

Ein beachtlicher Anteil der BrdU+ kortikalen Zellen exprimierte NG2. Dieser Befund ist in guter Übereinstimmung zu in der Literatur beschriebenen Daten. So fanden Jiang et al. bei über 50% der PCNA+ (Proliferating cell nuclear antigen+) Makroglia im Neocortex Koexpression von NG2 (Jiang et al., 1998). Reynolds und Hardy beschrieben die Koexpression von NG2 bei 74% aller kortikalen BrdU+ Zellen (Reynolds and Hardy, 1997). Die Überprüfung der Kolokalisation von NG2 und S100 β in BrdU+ kortikalen Zellen war leider nicht möglich, da beide Primärantikörper in der gleichen Spezies hergestellt worden waren. Eine Überlappung der NG2+/BrdU+ und der S100 β +/BrdU+ Zellpopulation, also die Existenz NG2+/S100 β +/BrdU+ kortikaler Zellen, wäre aber zu erwarten, da beide Zellpopulationen weit über 50% der gesamten BrdU+ Zellen ausmachen.

S100 β gilt gemeinhin als Marker eines astroglialen Phänotyps, während NG2 in Zusammenhang mit glialen, v.a. oligodendroglialen, Vorläufern gebracht wurde (Nishiyama, 2001; Levine et al., 2001; Dawson et al., 2000). Welche Zellpopulation *in vivo* durch die Expression von NG2 und S100 β gekennzeichnet sein könnte, ist nicht ganz klar. In der Literatur sind bipotente gliale Vorläuferzellen (O-2A-Vorläufer) beschrieben, die *in vitro* Oligodendrozyten und Typ-2-Astrozyten hervorbringen können sowie NG2 exprimieren (Lee et al., 2000; Ffrench-Constant and Raff, 1986). Erwähnt werden auch protoplasmatische Astrozyten, die *in vivo* NG2+ aber S100 β - sind (Levine and Card, 1987). Möglicherweise könnte es sich bei den NG2+S100 β +/BrdU+ Zellen um ein *in-vivo*-Korrelat der O-2A-Vorläuferzellen handeln. Daraus würde folgen, dass zumindest ein Teil der kortikalen S100 β +/BrdU+ Zellen nicht etwa neugebildeten reifen Astrozyten, sondern vielmehr unreifen glialen Vorläuferzellen, die *in vitro* verschiedene Gliazelltypen hervorbringen können, entsprechen würde. Es konnte gezeigt werden, dass NG2+ Zellen *in vivo* nur Oligodendrozyten hervorbringen.

Daß 4 Wochen nach den BrdU Injektionen immer noch ein sehr hoher Anteil der BrdU+ Zellen NG2+ ist, könnte bedeuten, daß kortikale NG2+/BrdU+ Vorläuferzellen nur sehr langsam oder überhaupt nicht differenzieren, oder daß NG2 auch von differenzierten Zellen exprimiert wird. Levison et al. (Levison et al., 1999) beschrieben die adulte Expansion kortikaler NG2+ Klone, die

nicht oligodendroglial differenzierten, sondern unreif blieben. In Zusammenschau mit dem Befund, dass sich im cerebralen Cortex nur wenige CNP+/BrdU+ Zellen finden ließen, deutet das Vorhandensein großer Mengen BrdU+ oligodendroglialer Vorläufer darauf hin, dass diese Zellen im cerebralen Cortex nur langsam oder teilweise gar nicht differenzieren.

Woher kommen adulte BrdU+ kortikale Zellen?

Lewis (Lewis, 1968) und Paterson (Paterson, 1983) deuteten die adulte subventrikuläre Zone (SVZ) als Reservoir für neugebildete Glia für das erwachsene Nagerhirn. Morshead und van der Kooy (Morshead and van der Kooy, 1992) behaupteten jedoch, daß in der SVZ adult neugebildete Zellen in der Regel sterben und nicht dem Zellumsatz im Cortex dienen. Levison et al. (Levison et al., 1999; Levison et al., 1993) zeigten, daß zwar Abkömmlinge von proliferierenden Zellen der SVZ perinatal in den Cortex auswandern, Migration im erwachsenen Hirn jedoch stärker begrenzt ist. Deswegen wurde vorgeschlagen, dass Zellneubildung im adulten Cortex eine Funktion lokaler kortikaler Zellteilung ist (Levison et al., 1999).

Zwei Stunden nach BrdU untersuchte Cortices (Daten nicht gezeigt) zeigten weit über den Cortex verteilte BrdU+ Zellen, die sehr häufig in Zweiergruppen gelagert waren, was für lokale kortikale Zellteilung spricht. Außerdem erbrachte der Vergleich der 1-Tag- und 4-Wochen-nach-BrdU-Werte keinen Hinweis auf intrazerebrale Migration BrdU+ Zellen.

Zusammenfassung

Sowohl makro- als auch mikrogliale Zellen scheinen im erwachsenen cerebralen Cortex der Maus einem ständigen Umsatz zu unterliegen. In dieser Arbeit wurde die Zellneubildung untersucht. Es konnte in Übereinstimmung mit vorausgegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass es Zellen aller 3 klassischen Gliatypen (Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikroglia) im adulten cerebralen Cortex gibt, die Immunreaktivität auf BrdU zeigen. Außerdem exprimierte eine große Zahl BrdU+ Zellen NG2. Dabei handelte es sich nach heute gängigen Vorstellungen um unreife Gliazellen. Wie sie sich genau in gliale Abstammungslinien einreihen lassen, ist nicht abschließend geklärt. In Zusammenschau mit in der Literatur beschriebenen Befunden ergibt sich

daraus das Bild einer ständigen Regeneration bzw. Ergänzung glialer Zellpopulationen im erwachsenen Cortex.

4.1.2 Adulte kortikale Neurogenese

Die Frage nach adult vorkommender kortikaler Neurogenese hat tiefgreifende Bedeutung für das Verständnis zellulärer Mechanismen höherer kognitiver Funktionen und wird hier deswegen ausführlich diskutiert.

Unter den hier beschriebenen Bedingungen konnte die Existenz adulter kortikaler Neurogenese nicht beobachtet werden. Eine fragwürdige Ausnahme waren schwach BrdU- und NeuN-immunreaktive Zellen, die sehr selten im frontalen Cortex gesehen wurden.

In dieser Studie wurden Neurone anhand der Expression von NeuN, einem in reifen Nervenzellen exprimierten Protein (Mullen et al., 1992), identifiziert. Hier wurde untersucht, ob es sich teilende kortikale Zellen oder sich teilende Zellen, die in den Cortex einwandern, gibt, die kurz- oder mittelfristig (innerhalb von 38 Tagen) NeuN exprimieren. Von tausenden analysierter BrdU+ Zellen über den gesamten cerebralen Cortex verteilt, zeigte keine BrdU+ Zellen eine zweifelsfreie Immunreaktivität auf NeuN. Daraus kann jedoch noch nicht zwingend geschlossen werden, dass es keine adulte kortikale Neubildung neuronaler Zellen gab. Schließlich ist nicht bekannt, wie sensitiv der immunhistochemische Nachweis von NeuN für die Detektion von Nervenzellen ist. Er gehört zur Zeit aber zu den verbreitetsten und weithin akzeptiertesten immunhistochemischen Nachweismethoden reifer neuronaler Zellen. Da NeuN erst spät im Differenzierungsverlauf exprimiert wird und wir keinen immunhistochemischen Marker unreifer Neurone verwendeten, wären unreife neuronale neugebildete Zellen im Cortex in dieser Studie nicht erkannt worden. Weil aber Gewebe auch zu einem späten Zeitpunkt nach den BrdU-Injektionen (38 Tage nach der ersten BrdU-Injektion) untersucht wurde, kann davon ausgegangen werden, dass potentiell proliferierende neuronale Vorläufer im Cortex Zeit zur Differenzierung gehabt hätten (sofern sie ausdifferenzierten) und dann über den immunhistochemischen Nachweis von NeuN detektierbar gewesen sein müssten.

Arsejjevic et al. isolierten Zellen aus dem frontalen und temporalen menschlichen Cortex, die in vitro in der Lage waren, sich selbst zu vermehren und Astrozyten, Oligodendrozyten sowie neuronale Zellen hervorzubringen (Arsenijevic et al., 2001). Allerdings fanden sich unter den neuronalen Abkömmlingen keine Zellen, die NeuN exprimierten, sondern ausschließlich Zellen, die Immunreaktivität auf die unreifen neuronalen Marker β -tubulin-III und MAP-2 (microtubule-associated protein-2) sowie NCAM (neural cell adhesion molecule) zeigten. Wie sich diese Zellen in vivo verhalten, wurde nicht untersucht. Möglicherweise sind sie in vivo nicht teilungsaktiv. Würden die von Arsejjevic beschriebenen in vitro unreif neuronal differenzierenden Vorläufer in vivo teilen und auch nicht vollständig ausreifen, wären sie in dieser Studie nicht entdeckt worden.

In gewissem Widerspruch stehen die hier dargestellten Ergebnisse zu Berichten aus der Arbeitsgruppe um Elisabeth Gould. Gould et al. untersuchten kortikale Zellproliferation und –differenzierung bei Primaten (Makaken) und berichteten von kortikaler Neurogenese, die sich in großem Umfang in Assoziationscortices fand (Gould et al., 2001; Gould et al., 1999b). Für den Sulcus principalis bezifferten Gould et al. den Anteil der NeuN+/BrdU+ Zellen an allen BrdU+ Zellen beispielsweise mit 38 - 52% (Gould et al., 1999b). Ebenfalls berichtet wurde über kortikale Neurogenese bei Ratten (Gould et al., 2001), wenn hierzu auch keine Daten angegeben wurden. Die Möglichkeit, dass ein derart hohes Maß an kortikaler Neurogeneses in der hier dargestellten Arbeit übersehen wurde, ist angesichts der großen Zahl analysierter BrdU+ Zellen nicht gegeben.

Gould et al. wiesen darauf hin, dass die kortikal neugebildeten Neurone transienter Natur seien und schon nach einigen Wochen überwiegend verschwunden wären (Gould et al., 2001). Jedenfalls müßten die hier gewählten Beobachtungszeitpunkte (1 Tag und 4 Wochen nach der letzten BrdU-Injektion) nach der von Gould et al. beschriebenen Kinetik kortikaler Neurogenese adäquat gewesen sein, adulte kortikale Neurogenese zu entdecken.

Erfahrungsgemäß war die Untersuchung BrdU+ Zellen auf Koloalisation mit NeuN prima vista nicht immer einfach und zweifelsfrei möglich. So fanden sich relativ häufig NeuN+ Zellen mit scheinbar BrdU-immunreaktiven Kernen.

Die Anfertigung optischer Schnitte senkrecht zur z-Achse mittels konfokaler Mikroskopie zeigte dann aber oftmals, dass die BrdU-immunreaktiven Kerne zu benachbarten glialen Zellen (sogenannten Satellitenzellen) und nicht den Neuronen gehörten. Es wäre jedenfalls vorstellbar, dass man bei der Phänotypisierung BrdU+ Zellen eine falsch positive Kolo-kalisation mit NeuN feststellen könnte.

Die hier dargestellten Befunde befinden sich in guter Übereinstimmung mit anderen Studien, die ebenfalls über nicht beobachtete adulte kortikale Neurogenese sowohl bei Primaten als auch bei Nagern berichteten (Rakic, 2002; Kornack and Rakic, 2001; Magavi et al., 2000; Rakic, 1985).

4.2 Veränderungen kortikaler Zellneubildung unter freiwilliger körperlicher Aktivität

Es konnte gezeigt werden, dass RUN (1) kortikale Zellproliferation global betrachtet nicht beeinflusst, (2) hippocampale Neurogenese steigert und (3) die Anzahl BrdU+ Mikroglia in bestimmten kortikalen Gebieten (im cingulären Cortex Schicht I, im motorischen Cortex Schicht I, im visuellen Cortex Schicht I-III) gegenüber CTR erhöht, während (4) die Anzahl anderer BrdU+ Zelltypen nicht beeinflusst wurde. RUN hatte also einen zelltyp- und lokalisations-spezifischen Effekt auf kortikale Zellproliferation.

Die Lokalisations-spezifität der kortikalen Wirkung von RUN konnte aber nur bezogen auf die *Gesamtzahl* BrdU+ Zellen Gültigkeit erlangen. Die Wirkung auf *BrdU+ Mikroglia* kann nur in den phänotypisierten kortikalen Bereichen (cingulärer Cortex I, motorischer Cortex I, visueller Cortex II/III) beurteilt werden. Ob RUN auch zu einer Zunahme der Zahl BrdU+ Mikrogliazellen in anderen kortikalen Abschnitten führte, konnte mit den hier zur Verfügung stehenden Daten nicht beantwortet werden. Da der Vergleich der Anzahl BrdU+ Zellen zwischen RUN und CTR in den anderen kortikalen Abschnitten jedoch keinen signifikanten Unterschied erbrachte, müsste die mögliche Zunahme BrdU+ Mikroglia in diesen Bereichen mit einer Abnahme anderer Phänotyp(en) der BrdU+ Zellen einhergehen.

Die relative Zunahme BrdU+ Mikroglia unter RUN konnte schon 1 Tag nach der letzten BrdU- Injektion gezeigt werden, was darauf hindeutet, dass es sich

hierbei um eine relativ prompte, zumindest innerhalb von 11 Tagen induzierbare Veränderung handelte.

Morphologie Iba1+/BrdU+ Zellen

Iba1+/BrdU+ Zellen hatten sowohl bei RUN als auch bei CTR die Morphologie ruhender, ramifizierter Mikroglia. Morphologisch war kein Unterschied zwischen den Iba1+/BrdU+ Zellen in Tieren der RUN- und der CTR-Gruppe feststellbar. Dies zeigt an, dass die Mikrogliazellen bei beiden Experimentalgruppen offenbar nicht aktiviert waren bzw. sich bezüglich des Aktivierungsgrades nicht unterschieden.

Entwicklung Iba1+/BrdU+ Zellen

Gegenüber dem frühen Untersuchungszeitpunkt konnte 4 Wochen nach BrdU eine Zunahme BrdU+ Mikroglia sowohl bei RUN als auch bei CTR gezeigt werden. Die Iba1+/BrdU+ Zellen 4 Wochen nach BrdU unterschieden sich morphologisch nicht von denen 1 Tag nach BrdU

Herkunft Iba1+/BrdU+ Zellen

In der Literatur ist sowohl die Proliferationsfähigkeit hirnständiger Mikroglia (Eliason et al., 2002; Glenn et al., 1992; Lawson et al., 1992; Alliot et al., 1991), als auch eine ständige Einwanderung von Zellen hämatopoetischer Herkunft, die im ZNS mikroglial differenzieren (Priller et al., 2001; Eglitis and Mezey, 1997; Hickey et al., 1992; Lawson et al., 1992), beschrieben. Demzufolge könnte die Zunahme der Anzahl BrdU+ Mikroglia über 4 Wochen entweder durch eine anhaltende Proliferation markierter Mikroglia im Verlauf, eine fortgesetzte Einwanderung hämatopoetischer mikroglialer Vorläufer oder eine Kombination aus beidem begründet sein. Theoretisch möglich wäre auch eine Veränderung der Anzahl BrdU+ Mikroglia im Verlauf durch intrazerebrale Migration. Diese Deutung ist aufgrund der Datenlage allerdings eher unwahrscheinlich. Durch in Vorbereitung befindliche Experimente soll geklärt werden, welcher Anteil der BrdU+ Mikroglia auf aus dem Blut einwandernde Zellen und welcher auf lokal kortikal proliferierende Zellen zurückzuführen ist. Von Interesse ist dabei die Frage, ob die Zunahme neugebildeter Mikroglia unter RUN auf Einwanderung, lokale Proliferation

oder eine Kombination aus beidem zurückzuführen ist. In diesem Zusammenhang deuten die bekannte Monozytose unter körperlicher Belastung (Shephard and Shek, 1994; Pedersen, 1991; Tvede et al., 1989) und die Beeinflussung von Adhäsionsfunktionen durch körperliche Aktivität (Miles et al., 1998), die bei der Verteilung von Leukozyten zwischen Blut und Geweben eine Rolle spielen, auf mögliche zugrunde liegende Mechanismen einer verstärkten Einwanderung von Zellen hämatopoetischer Herkunft in periphere Gewebe unter körperlicher Belastung hin. Die Hypothese, dass der verstärkten kortikalen Mikrogliazellneubildung eine verstärkte Einwanderung von Zellen hämatopoetischer Abstammung zugrunde liegt, wird gestützt durch den Befund, dass körperliche Aktivität zu einer verstärkten Einwanderung von Monozyten in periphere entzündete Gewebe führte (Woods and Davis, 1994).

Mikrogliale Funktionen

Zur mikroglialen Funktion liegen zur Zeit vor allem Befunde vor, die die Bedeutung der Mikrogliazelle bei pathologischen Prozessen im ZNS, wie Inflammation, Ischämie, Trauma, Degeneration etc. hervorheben (Nakajima and Kohsaka, 2001; Gonzalez-Scarano and Baltuch, 1999; Gehrman, 1996; Kreutzberg, 1996; Gehrman et al., 1995; Kreutzberg, 1995; Davis et al., 1994; Gehrman and Kreutzberg, 1994; Thomas, 1992; Graeber and Streit, 1990; Perry and Gordon, 1988).

Mikroglia stellt dabei einen zentralen Bestandteil und die erste Linie des Abwehrsystems innerhalb des ZNS dar und ist an wesentlichen regenerativen, aber auch destruktiven Funktionen beteiligt. Im nicht pathologisch veränderten Gehirn liegen mikrogliale Zellen in einer ruhenden Form vor, über deren funktionelle Bedeutung sehr wenig bekannt ist. Im Zuge eines adäquaten Reizes, wie beispielsweise einer zentralnervösen Infektion, kommt es zur mikroglialen Aktivierung. Diese Aktivierung umfasst verschiedene Komponenten, die auch abgestuft ausgelöst werden können. Dazu gehören mikrogliale Proliferation, Expression verschiedener Aktivierungsmarker (z.B. Komplementrezeptoren, MHC-II-Komplex) und schließlich die phagozytische Transformation.

Weitgehend unklar ist, welche Funktionen Mikroglia unter physiologischen Bedingungen in ihrer Ruheform wahrnimmt (oder ob die Ruheform keine

weitere Rolle spielt). Immerhin wissen wir, dass Mikroglia via Sekretion neurotropher Faktoren Einfluß auf die Funktion neuronaler Zellen nehmen kann (Fields and Stevens-Graham, 2002; Elkabes et al., 1996). Die Beeinflussbarkeit mikroglialer Zellneubildung im Cortex durch eine vollkommen physiologische Tätigkeit wie körperliche Aktivität, könnte vermuten lassen, dass dieser Zelltyp unter physiologischen Bedingungen möglicherweise eine größere Rolle spielt, als bisher angenommen wurde.

Welche Bedeutung hat die gesteigerte kortikale Neubildung von Mikroglia unter körperlicher Aktivität?

Hypothese 1: Die Zunahme mikroglialer kortikaler Neubildung mediert kognitive Veränderungen unter gesteigerter körperlicher Aktivität.

Vielfach beschrieben sind die leistungssteigernden Effekte von körperlicher Aktivität auf bestimmte kognitive Funktionen (Cotman and Engesser-Cesar, 2002; Taylor et al., 1985). Wie erwähnt üben Mikrogliazellen via Sekretion neurotropher Faktoren supportive Funktionen aus (Fields and Stevens-Graham, 2002; Elkabes et al., 1996). Dies wäre ein möglicher Mechanismus, wie Mikroglia Einfluß auf die Funktion neuronaler Netzwerke nehmen könnte.

Auf der Suche nach substantiellen Korrelaten der auf Verhaltensebene nachgewiesenen Effekten von körperlicher Aktivität (Beeinflussung kognitiver Funktionen), könnte der hier beschriebene Effekt von RUN auf neue kortikale Mikrogliazellen zumindest ein Teilaspekt der die kognitive Leistungssteigerung mediiierenden Mechanismen sein. Gegenwärtige Vorstellungen der substantiellen Grundlage von Verhaltensplastizität (zum Beispiel Lernen) beziehen sich vor allem auf *synaptische* Mechanismen. Die Entdeckung *hippokampaler Neurogenese* (Altman and Das, 1965b) und ihre Beeinflussbarkeit durch Zustände (reizreiche Umgebung und körperliche Aktivität) (van Praag et al., 1999; Kempermann et al., 1997), die starken Einfluß auf kognitive Funktionen zu nehmen vermögen, legten den Verdacht nahe, dass Prozesse adulter Zellneubildung als Kandidaten der funktionellen Plastizität zugrunde liegenden Mechanismen in Frage kommen. Tatsächlich gibt es einige Befunde, die eine Beteiligung hippocampaler Neurogenese bei Lernen und Gedächtnisbildung vorschlagen (Shors et al., 2001; Gould et al.,

1999). Inwiefern *kortikale* Zellneubildungsvorgänge Bedeutung für die funktionelle Plastizität des Nervensystems haben, ist gegenwärtig schwer zu sagen und experimentell auch schwerer zu adressieren. Während in dieser Studie unter ENR eine geringere Beeinträchtigung zellulärer kortikaler Neogenese gesehen wurde, fallen die Veränderungen der mikroglialen kortikalen Zellneubildung unter RUN quantitativ stärker ins Gewicht.

Hypothese 2: Die verstärkte kortikale Mikrogliazellneubildung unter RUN ist Teil allgemeiner Veränderung der immunologischen Funktionslage unter gesteigerter körperlicher Aktivität.

Es ist gut belegt, dass körperliche Aktivität in Abhängigkeit von ihrem Ausmaß und dem individuellen Trainingsstand zum Teil ausgeprägten Einfluß auf das Immunsystem hat. Während moderater körperlicher Aktivität ein abwehrstärkender Effekt nachgesagt wird, hat ausgedehnte und/oder intensive physische Belastung Immunsuppression zur Folge, so kommt es beispielsweise zu einer Erhöhung des Risikos an einem Infekt des oberen Respirationstraktes zu erkranken (Nieman, 2001). Epidemiologische Studien weisen auf eine Assoziation von gesteigerter körperlicher Aktivität und einer niedrigeren Prävalenz und Mortalität von verschiedenen bösartigen Tumoren hin (Hardman, 2001; McTiernan et al., 1998; Woods and Davis, 1994). Der zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch unklar.

Jedenfalls beeinflusst körperliche Aktivität eine ganze Reihe messbarer immunologischer Parameter: so kommt es zur Alteration von Zytokinspiegeln (Espersen et al., 1990) und zu zellulären Veränderung im peripheren Blut. Oft beschrieben wird eine Leukozytose, die besonders durch einen Anstieg der Monozyten und neutrophilen Granulozyten bedingt ist (Shephard and Shek, 1994). Die Effekte auf die zellulären Komponenten des spezifischen Immunsystems im peripheren Blut hängen vom Ausmaß der körperlichen Belastung ab (Shephard and Shek, 1994). Sie variieren in der Literatur etwas, übereinstimmend wird jedoch eine Alteration von verschiedenen Lymphozytenpopulationen und der Immunglobulinspiegel berichtet (Boyum et al., 1996; Shephard and Shek, 1994; Pedersen, 1991; Espersen et al., 1990; Tvede et al., 1989). Im Zusammenhang mit dieser Studie besonders interessant sind Befunde, die einen verstärkten Influx von Monozyten unter körperlicher

Aktivität in entzündliches Gewebe beschreiben (Woods and Davis, 1994). Außerdem führt körperliche Aktivität zu einer Beeinträchtigung bestimmter Schritte des phagozytischen Prozesses (Ortega, 1994). Körperliche Aktivität hat Wirkungen auf leukozytäre Adhäsionsmoleküle (Gabriel and Kindermann, 1998; Gabriel et al., 1994) und könnte auf diese Weise Einfluß auf die Verteilung von Leukozyten im Organismus nehmen.

Als vermittelnde Mechanismen der immunologischen Effekte körperlicher Aktivität wurden neuroendokrine Veränderungen, vor allem eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems, der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse und eine verstärkte Freisetzung von Neuropeptiden (z.B. endogener Opioide) diskutiert (Jonsdottir, 2000; Benschop et al., 1996; Weicker and Werle, 1991). Die Beeinflussung von Zytokin-Netzwerken durch körperliche Aktivität (Moldoveanu et al., 2001) könnte ebenso verschiedenste Effekte auf zelluläre Komponenten des Immunsystems vermitteln.

Zusammengefaßt geht körperliche Aktivität mit einer komplexen Wirkung auf verschiedene Komponenten des Immunsystems einher. In diesem Zusammenhang könnte es im Rahmen generalisierter leukozytärer Umverteilungsprozesse unter körperlicher Aktivität nicht nur zu einer verstärkten Einwanderung neugebildeter Monozyten in den cerebralen Cortex, sondern zusätzlich zu Effekten auf die Verteilungsverhältnisse im histiozytären System anderer Gewebe kommen.

Mögliche therapeutische Implikationen der verstärkten mikroglialen kortikalen Neubildung durch körperliche Aktivität

Die Blut-Hirn-Schranke stellt eine effiziente Barriere zwischen dem ZNS und dem Blut bzw. peripheren Geweben dar. Therapeutische Manipulationen (z.B. pharmakologische) am ZNS werden oft dadurch erschwert, daß verschiedene Substanzen über diese Barriere gebracht werden müssen.

Zellen, die in der Lage sind, über die intakte Blut-Hirn-Schranke ins ZNS einzuwandern (z.B. Monozyten), könnten als Transporteur therapeutischen Materials (z.B. bestimmter Gene) über die Blut-Hirn-Schranke verwendet werden.

Wenn körperliche Aktivität tatsächlich zu einer vermehrten Einwanderung hämatopoetischer Zellen über die intakte Blut-Hirn-Schranke führt, ließe sie

sich zur Verstärkung des zellulären Transportes therapeutischen Materials über die Blut-Hirn-Schranke einsetzen.

Weiterhin ist es von medizinischem Interesse die substantiellen Grundlagen der cerebral leistungssteigernden Effekte körperlicher Aktivität (Cotman and Engesser-Cesar, 2002; Taylor et al., 1985) zu erforschen, um mögliche Ansätze für therapeutische Manipulationen zu erhalten. Vielleicht stellt der hier beschriebene Effekt körperlicher Aktivität auf mikrogliale kortikale Neogenese zumindestens eine Komponente der die kognitive Leistungssteigerung vermittelnden substantiellen Grundlagen dar.

4.3 Veränderungen kortikaler Zellneubildung unter den Bedingungen reizreicher Lebensumgebung

Die im Ergebnisteil dargestellten Befunde sprechen dafür, dass RUN und ENR adulte kortikale Zellneubildung differentiell regulieren. Die beobachteten Effekte von ENR auf kortikale Zellproliferation und Zellneubildungen waren offensichtlich quantitativ deutlich geringer ausgeprägt und anders geartet als die von RUN. Während die regional beobachteten Effekte von RUN auf kortikale Zellneubildung auf eine Zunahme neugebildeter Mikroglia zurückzuführen waren und andere Zellpopulationen nicht beeinflusst wurden, beeinflusste ENR diese Zellpopulation überhaupt nicht. Umgekehrt schien ENR in gewissem, eher begrenztem Maße Einfluß auf kortikale Astrozytogenese zu haben, was bei RUN nicht der Fall war. Da diese Veränderungen jedoch nur in Schicht I des motorischen Cortex das Signifikanzniveau erreichten und in den anderen phänotypisierten kortikalen Bereichen kein signifikanter Unterschied zwischen ENR und CTR (was die Anzahl S100 β + / BrdU+ Zellen anbelangt) zu finden war, muss die Interpretation, inwiefern ENR kortikale Astrozytogenese steigern kann, weiter untersucht werden. Allerdings unterstützt die Gleichrichtung der Daten in verschiedenen kortikalen Bereichen diese Deutung.

Die meisten der in der Literatur beschriebenen Effekte einer reizreichen Umgebung auf den cerebralen Cortex (siehe Kapitel 1.3) traten nicht überall im Cortex in gleicher Weise auf, sondern zeigten bezüglich ihres Ausprägungsgrades eine regionale Spezifität.

So beschrieben Bennett et al. eine Zunahme des kortikalen Gewichtes und der kortikalen Cholinesteraseaktivität unter einer reizreichen Umgebung, die regional unterschiedlich stark ausgeprägt waren: Die stärksten Effekte zeigten sich im visuellen Cortex, die geringfügigsten im somatosensorischen Cortex (Bennett et al., 1964).

Eine reizreiche Umgebung führte zu Dickenzunahmen des erwachsenen Cortex der Ratte, die regional unterschiedlich starker Ausprägung waren: generell waren die Veränderungen unter einer reizreichen Umgebung in medialen und okzipitalen Cortexgebieten stärker ausgeprägt als lateral und frontal. Minimale Effekte fanden sich im motorischen und somatosensorischen Cortex (Walsh, 1981). Diamond et al. zeigten, dass die Zunahme der kortikalen Dicke im visuellen Cortex, vor allem auf Veränderungen von Schicht II/III zurückzuführen waren (Diamond et al., 1964).

Es gab auch Hinweise darauf, dass die absolute Gliazellzahl in kortikalen Bereichen bei Tieren, die in einer reizreichen Umgebung gehalten wurden, von Kontrolltieren abwichen (Diamond et al., 1964). Jedenfalls sind Befunde, die auf dem Vergleich von *Zelldichten* beruhen, kritisch zu sehen, ist doch völlig unklar, welche Variable zur Veränderung eines Zelldichtewertes führt. Diamond et al. berichtete über eine Zunahme der Dichte vor allem von Oligodendrozyten im okzipitalen Cortex unter einer reizreichen Umgebung (Diamond et al., 1966). Ähnliche Veränderungen konnten auch Szeligo et al. beobachten (Szeligo and Leblond, 1977).

Die Gruppe um William Greenough studierte verschiedene Aspekte von durch eine reizreiche Umgebung induzierten Veränderungen im visuellen Cortex. Ein großer Teil dieser Studien befasste sich mit astrozytären Veränderungen durch eine reizreiche Umgebung im visuellen Cortex. Vereinfachend kann man diese astrozytäre Reaktion nach Sirevaag et al. in zwei Phasen einteilen: Initial kam es zur astrozytären Hypertrophie (Wachstum von Zellkörper und Fortsätzen). Zwischen dem Tag 30 und 67 der Einwirkung einer reizreichen Umgebung setzte eine astrozytäre Hyperplasie ein. Eine astrozytäre Proliferation wurde allerdings nicht direkt nachgewiesen, sondern die astrozytäre Gesamtzellzahl bestimmt und ein Effekt auf die astrozytäre Proliferation postuliert (Sirevaag and Greenough, 1991). Dass eine reizreiche Lebensumgebung tatsächlich

Wirkungen auf astrozytäre kortikale Zellneubildung hat, konnte in dieser Arbeit unter anderem im visuellen Cortex gezeigt werden.

Die von Sirevaag et al. beschriebenen astrozytären Veränderungen im visuellen Cortex gingen den neuronalen Veränderungen teilweise voraus. Nach 30 Tagen reizreicher Umgebung kam zur Hypertrophie der Dendriten (Greenough and Volkmar, 1973), zu einer Zunahme der Synapsenanzahl pro Neuron (Turner and Greenough, 1985) und einer Veränderung der synaptischen Kontaktfläche im visuellen Cortex (Sirevaag and Greenough, 1985). Die Kapillarzahl pro Neuron stieg an (Black et al., 1987).

Diese durch eine reizreiche Umgebung im *visuellen* Cortex auslösbaren Veränderungen konnten im motorischen, somatosensorischen und auditorischen Cortex nicht gezeigt werden (Beaulieu and Colonnier, 1989a; Beaulieu and Colonnier, 1989b).

Die in der Literatur beschriebene regionale Spezifität der kortikalen Veränderungen, die durch eine reizreiche Umgebung auslösbar waren, deckte sich teilweise gut mit den hier dargestellten Befunden. So konnte auch hier der deutlichste und konsistenteste Effekt von ENR auf kortikale Zellneubildung im visuellen Cortex gesehen werden. Schicht II/III des visuellen Cortex, dessen Sensitivität auf eine reizreiche Umwelt vorbeschrieben war (Walsh, 1981; Szeligo and Leblond, 1977; Diamond et al., 1964), zeigte auch in dieser Arbeit relativ markante Veränderungen. Allerdings waren offenbar verschiedenste kortikale Bereiche in die Reaktion auf ENR involviert. So zeigten der frontale, motorische, cinguläre und somatosensorische Cortex (wenn auch meist nicht signifikante) Unterschiede bezüglich der Anzahl der BrdU+ Zellen zwischen ENR und CTR. Jedenfalls ergab sich bezüglich kortikaler Zellneubildung nicht der Eindruck einer einfachen regionalen Spezifität auf ENR in dem Sinne, dass Veränderungen ausschließlich in bestimmten kortikalen Regionen zu beobachten gewesen wären. Vielmehr schien es einen gleichgerichteten Unterschied zwischen ENR und CTR in verschiedenen kortikalen Regionen zu geben, der dann im regionalen Ausprägungsgrad etwas variierte.

Astrozytäre Funktionen

Astrozyten übernehmen vielfältige Funktionen im Gehirn (Kandel, 2000): Sie sind an der Abgrenzung des Parenchyms gegenüber Oberflächen und Gefäßen

beteiligt, regulieren die extrazellulären ionalen Verhältnisse (Newman et al., 1984; Kuffler, 1967), sezernieren Wachstumsfaktoren, modulieren Synaptogenese (Meshul et al., 1987) etc.

Neuerdings wurde die Vermutung formuliert, dass Astrozyten Vorläuferzeileigenschaften hätten (Doetsch et al., 1999). Grundlage dieser Hypothese war die Beobachtung, dass proliferierende Vorläuferzellen in der SVZ, die letztlich im Bulbus olfactorius integrierende Interneurone hervorbrachten, vorübergehend GFAP (klassischerweise als Marker für reife Astrozyten angesehen) exprimierten. Außerdem übernahmen hippokampale Astrozyten offenbar regulatorische Funktionen bei adulter hippokampaler Neurogenese (Song et al., 2002). Damit häufen sich Befunde, die darauf hindeuten, dass Astrozyten im erwachsenen Gehirn Funktionen ausüben, die weit über die nur supportiven Aufgaben hinausgehen, die man ihnen klassischerweise zugeordnet hatte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde beobachtet, dass viele der BrdU+ kortikalen Zellen S100 β und/oder NG2 exprimierten. S100 β wird allgemein als Marker eines astrozytären Phänotyps, NG2 als Antigen, was von unreifen Gliazellen exprimiert wird, angesehen. Es existieren zwar in-vitro-Daten, die eine Koexpression von NG2 und S100 β bei O-2A-Vorläufern beschreiben (Lee, 2000). Über eine Zellpopulation, die in vivo durch Expression dieser beiden Antigene charakterisiert wird, ist jedoch bisher nicht berichtet worden. Wie oben ausgeführt wurde, ist aber davon auszugehen, dass zumindest ein Teil der kortikalen S100 β +BrdU+ Zellen in dieser Studie NG2 koexprimierte. Möglicherweise handelte es sich bei dieser Zellpopulation um ein in-vivo-Korrelat der O-2A-Vorläufer.

Die klassischerweise als spezifisch astrozytär angesehenen Marker S100 β und – oben erwähnt – GFAP würden folglich von gänzlich verschiedenen Zellpopulationen exprimiert werden: im Cortex (unter anderem) von einer NG2+/S100 β + Zellpopulation mit unbekannter Funktion, in der SVZ von einer Stammzellpopulation und im Hippokampus von einer Zellpopulation, die Neurogenese regulieren kann. Es stellt sich die Frage, ob die klassischen Astrozytenmarker nicht auch von anderen Zellpopulationen exprimiert werden. Anders formuliert, könnte man fragen, ob *der Astrozyt* ausreichend präzise

definiert ist, oder ob sich nicht eher Zellen verschiedener Eigenschaften hinter diesem Begriff verbergen.

Möglicherweise könnte eine Beeinflussung kortikaler Astrozytogenese durch ENR eine Rolle bei adaptiven Prozessen des ZNS unter variablen Umgebungsbedingungen spielen. So waren bereits, wie oben ausgeführt, astrozytäre Veränderungen im visuellen Cortex unter einer reizreichen Lebensumgebung mit synaptischen Adaptationsprozessen in Verbindung gebracht worden (Jones et al., 1996; Jones and Greenough, 1996; Sirevaag and Greenough, 1991). In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass visuelle Deprivation zu parallelen Effekten auf Astrozyten und Synapsen im visuellen Cortex, die möglicherweise zusammenhängen, führte (Gabbott et al., 1986). ange bekannt ist auch eine astrozytäre Reaktion auf verschiedene Schadensereignisse innerhalb des ZNS, die sogenannte Gliose. Auch hier ist die funktionelle Bedeutung der astrozytären Reaktion nicht völlig geklärt. Immerhin konnte gezeigt werden, dass die Verpflanzung von Astrozyten in das geschädigte Gehirn, die funktionelle Rehabilitation zu fördern vermag (Kesslak et al., 1986).

Insgesamt läßt sich erkennen, daß die Vorläuferzellen der kortikalen Makroglia offensichtlich weniger empfindlich auf Umweltbedingungen bzw. physiologische Aktivierungszustände, wie in diesem Experiment verwendet, reagieren, als die der Mikroglia.

5 Zusammenfassung

Es wurde Zellneubildung im erwachsenen cerebralen Cortex der Maus in Abhängigkeit von Umweltbedingungen und Aktivitätsgrad untersucht. Es war bekannt, dass eine reizreiche Umgebung und körperliche Aktivität die Neubildung von Nervenzellen im erwachsenen Hippokampus steigern.

Als Zellproliferationsmarker wurde BrdU appliziert und BrdU-inkorporierende Zellen 1 Tag und 4 Wochen nach BrdU-Gabe unter Verwendung immunhistochemischer Methoden zur Detektion BrdU-inkorporierender Zellen in verschiedenen kortikalen Regionen und Schichten quantifiziert. Die phänotypische Charakterisierung BrdU+ Zellen wurde durch kombinierte Verwendung immunhistochemischer Methoden und konfokaler Mikroskopie vorgenommen.

Die im adulten murinen cerebralen Cortex proliferierenden Zellen differenzierten weit überwiegend glial. Keine der kortikalen BrdU+ Zellen zeigte zweifelsfreie Zeichen einer neuronalen Differenzierung. Damit scheint die adulte Nervenzellneubildung unter physiologischen Bedingungen eine regionale Spezialität des Hippokampus und anderer Strukturen zu sein.

Weder körperliche Aktivität (RUN) noch eine reizreiche Umgebung (ENR) führten 1 Tag oder 4 Wochen nach BrdU zu einem signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (CTR), was die Anzahl BrdU+ Zellen im *gesamten* Cortex zusammengefaßt betrifft. Dagegen konnten die vorbeschriebenen Effekte von RUN und ENR auf hippokampale BrdU-inkorporierende Zellen repliziert werden. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass die Verstärkung adulter Neurogenese durch RUN und ENR im Gyrus dentatus des Hippokampus eine hippokampus-spezifische Reaktion und nicht etwa Teil einer generalisierten zentralnervösen Reaktion ist.

Jedoch konnte gezeigt werden, dass körperliche Aktivität und eine reizreiche Umgebung zur *lokalen* Beeinflussung kortikaler Zellneubildung in bestimmten Schichten und Regionen führten. So konnten bei RUN-Tieren signifikant mehr BrdU+ Zellen in Schicht I des cingulären, motorischen und visuellen Cortex als bei CTR-Tieren gefunden werden. ENR-Tiere hatten 4 Wochen nach BrdU signifikant mehr BrdU+ Zellen in Schicht II/III des visuellen Cortex als CTR-Tiere. Die Phänotypisierung BrdU+ Zellen in diesen kortikalen Bereichen

ergab, dass RUN zu einer lokalen, deutlich ausgeprägten Verstärkung der Neubildung von Mikroglia führte, während ENR tendentiell lokal kortikale Astrozytogenese verstärkte (signifikant in Schicht I des motorischen Cortex 4 Wochen nach BrdU).

Damit konnte erstmals berichtet werden, dass körperliche Aktivität zelltypspezifisch die Neubildung kortikaler Mikroglia stimuliert. Dieses Ergebnis ist zunächst überraschend, da mikrogliale Proliferation und Aktivierung klassischweise im Zusammenhang mit Schadenszuständen des ZNS gesehen werden. In der Tat ist dies einer der ersten Befunde, der eine mikrogliale Reaktion mit nicht-pathologischen, vollkommen physiologischen Bedingungen in Verbindung bringt. Dies könnte einen neuen Blickwinkel auf mikrogliale Funktionen eröffnen.

Die Effekte einer reizreichen Umgebung auf kortikale Zellneubildung waren weniger stark ausgeprägt und bezogen sich auf Astrozyten (signifikant im motorischen Cortex I 4 Wochen nach BrdU). Es ist unbekannt, ob die Verstärkung kortikaler Astrozytogenese unter ENR eine Rolle bei funktionellen zentralnervösen Anpassungsprozessen spielt.

Die Untersuchung physiologischerweise im adulten cerebralen Cortex vorkommender Zellneubildung könnte mittelfristig einen erfolgsversprechenden Ansatz für Zellersatzstrategien bei verschiedensten Schadenszuständen des ZNS hervorbringen. Ein bisher erst in Ansätzen erforschtes Feld ist auch, welche Rolle Zellneubildungsvorgänge im erwachsenen ZNS im Rahmen funktioneller Plastizität spielen. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten darauf hinweisen, dass neugebildete gliale Zellen in diesem Zusammenhang eine größere Rolle spielen könnten, als bisher angenommen wurde.

Literaturverzeichnis

- Alliot F, Lecain E, Grima B, Pessac B (1991) Microglial progenitors with a high proliferative potential in the embryonic and adult mouse brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88: 1541-1545
- Altman J (1966) Proliferation and migration of undifferentiated precursor cells in the rat during postnatal gliogenesis. *Exp.Neurol.* 16: 263-278
- Altman J, Das GD (1965b) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J.Comp Neurol.* 124: 319
- Altman J, Das GD (1965a) Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature* 207: 953-956
- Altman J, Das GD (1967) Postnatal neurogenesis in the guinea-pig. *Nature* 214: 1098-1101
- Alvarez-Buylla A, Nottebohm F (1988) Migration of young neurons in adult avian brain. *Nature* 335: 353
- Amaral, DG: Principles of Neural Science. Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. 4th edition, 331. 2000. McGraw-Hill.
- Arsenijevic Y, Villemure JG, Brunet JF, Bloch JJ, Deglon N, Kostic C, Zurn A, Aebischer P (2001) Isolation of multipotent neural precursors residing in the cortex of the adult human brain. *Exp.Neurol.* 170: 48-62
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Zokaia Z, Lindvall O (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat.Med.* 8: 963
- Beaulieu C, Colonnier M (1987) Effect of the richness of the environment on the cat visual cortex. *J.Comp Neurol.* 266: 478-494
- Beaulieu C, Colonnier M (1989b) Effects of the richness of the environment on six different cortical areas of the cat cerebral cortex. *Brain Res.* 495: 382-386
- Beaulieu C, Colonnier M (1989c) Effects of the richness of the environment on six different cortical areas of the cat cerebral cortex. *Brain Res.* 495: 382-386
- Beaulieu C, Colonnier M (1989a) Number and size of neurons and synapses in the motor cortex of cats raised in different environmental complexities. *J.Comp Neurol.* 289: 178-181
- Bennett EL, Diamond MC, Krech D, Rosenzweig MR (1964) Chemical and anatomical plasticity of the brain. *Science* 146: 610-619
- Benschop RJ, Rodriguez-Feuerhahn M, Schedlowski M (1996) Catecholamine-induced leukocytosis: early observations, current research, and future directions. *Brain Behav.Immun.* 10: 77-91
- Black JE, Isaacs KR, Anderson BJ, Alcantara AA, Greenough WT (1990) Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87: 5568-5572
- Black JE, Sirevaag AM, Greenough WT (1987) Complex experience promotes capillary formation in young rat visual cortex. *Neurosci.Lett.* 83: 351-355
- Boyum A, Wiik P, Gustavsson E, Veiby OP, Reseland J, Haugen AH, Opstad PK (1996) The effect of strenuous exercise, calorie deficiency and sleep deprivation on white blood cells, plasma immunoglobulins and cytokines. *Scand.J.Immunol.* 43: 228-235

- Brodmann K (1909) Vergleichende Lokalisationslehre der Großhirnrinde. JA Barth, Leipzig
- Cameron HA, McKay RD (2001) Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J.Comp Neurol.* 435: 406-417
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56: 337
- Cao Q, Benton RL, Whittemore SR (2002) Stem cell repair of central nervous system injury. *J.Neurosci.Res.* 68: 501-510
- Cecchi GA, Petreanu LT, Alvarez-Buylla A, Magnasco MO (2001) Unsupervised learning and adaptation in a model of adult neurogenesis. *J.Comput.Neurosci.* 11: 175-182
- Cooper-Kuhn CM, Kuhn HG (2002) Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 134: 13-21
- Corotto FS, Henegar JR, Maruniak JA (1994) Odor deprivation leads to reduced neurogenesis and reduced neuronal survival in the olfactory bulb of the adult mouse. *Neuroscience* 61: 739-744
- Cotman CW, Engesser-Cesar C (2002) Exercise enhances and protects brain function. *Exerc.Sport Sci.Rev.* 30: 75-79
- Davis EJ, Foster TD, Thomas WE (1994) Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res.Bull.* 34: 73-78
- Dawson MR, Levine JM, Reynolds R (2000) NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors? *J.Neurosci.Res.* 61: 471-479
- Delp MD, Armstrong RB, Godfrey DA, Laughlin MH, Ross CD, Wilkerson MK (2001) Exercise increases blood flow to locomotor, vestibular, cardiorespiratory and visual regions of the brain in miniature swine. *J.Physiol.* 533: 849-859
- Diamond MC, Diamond MC, Bennett EL, Rosenzweig MR, Lindner B (1971) Quantitative synaptic changes with differential experience in rat brain. *Int.J.Neurosci.* 2: 113
- Diamond MC, Ingham CA, Johnson RE, Bennett EL, Rosenzweig MR (1976) Effects of environment on morphology of rat cerebral cortex and hippocampus. *J.Neurobiol.* 7: 75-85
- Diamond MC, Krech D, Rosenzweig MR (1964) The effects of an enriched environment on the histology of the rat cerebral cortex. *J.Comp Neurol.* 123: 111-120
- Diamond MC, Law F, Rhodes H, Lindner B, Rosenzweig MR, Krech D, Bennett EL (1966) Increases in cortical depth and glia numbers in rats subjected to enriched environment. *J.Comp Neurol.* 128: 117-126
- Diamond MC, Rosenzweig MR, Bennett EL, Lindner B, Lyon L (1972) Effects of environmental enrichment and impoverishment on rat cerebral cortex. *J.Neurobiol.* 3: 47-64
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97: 703-716
- Eglitis MA, Mezey E (1997) Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94: 4080-4085
- Eliason DA, Cohen SA, Baratta J, Yu J, Robertson RT (2002) Local proliferation of

- microglia cells in response to neocortical injury in vitro. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 137: 75-79
- Elkabes S, DiCicco-Bloom EM, Black IB (1996) Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J.Neurosci.* 16: 2508-2521
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat.Med.* 4: 1313
- Espersen GT, Elbaek A, Ernst E, Toft E, Kaalund S, Jersild C, Grunnet N (1990) Effect of physical exercise on cytokines and lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *APMIS* 98: 395-400
- Ffrench-Constant C, Raff MC (1986) Proliferating bipotential glial progenitor cells in adult rat optic nerve. *Nature* 319: 499-502
- Fields RD, Stevens-Graham B (2002) New insights into neuron-glia communication. *Science* 298: 556-562
- Gabbott PL, Stewart MG, Rose SP (1986) The quantitative effects of dark-rearing and light exposure on the laminar composition and depth distribution of neurons and glia in the visual cortex (area 17) of the rat. *Exp.Brain Res.* 64: 225-232
- Gabriel H, Brechtel L, Urhausen A, Kindermann W (1994) Recruitment and recirculation of leukocytes after an ultramarathon run: preferential homing of cells expressing high levels of the adhesion molecule LFA-1. *Int J.Sports Med.* 15 Suppl 3: S148-S153
- Gabriel HH, Kindermann W (1998) Adhesion molecules during immune response to exercise. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 76: 512-523
- Gehrmann J (1996) Microglia: a sensor to threats in the nervous system? *Res.Virol.* 147: 79-88
- Gehrmann J, Kreutzberg GW (1994) Experimental models to study microglial in vivo. The activated microglia: an early response element in the injured CNS? *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* 20: 180-182
- Gehrmann J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW (1995) Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 20: 269-287
- Gensert JM, Goldman JE (2001) Heterogeneity of cycling glial progenitors in the adult mammalian cortex and white matter. *J.Neurobiol.* 48: 75-86
- Ghandour MS, Langley OK, Labourdette G, Vincendon G, Gombos G (1981) Specific and artefactual cellular localizations of S 100 protein: an astrocyte marker in rat cerebellum. *Dev.Neurosci.* 4: 66-78
- Glenn JA, Ward SA, Stone CR, Booth PL, Thomas WE (1992) Characterisation of ramified microglial cells: detailed morphology, morphological plasticity and proliferative capability. *J.Anat.* 180: 109-118
- Goldman SA (1998) Adult neurogenesis: from canaries to the clinic. *J.Neurobiol.* 36: 267-286
- Gomez-Pinilla F, Dao L, So V (1997) Physical exercise induces FGF-2 and its mRNA in the hippocampus. *Brain Res.* 764: 1-8
- Gomez-Pinilla F, So V, Kesslak JP (1998) Spatial learning and physical activity contribute to the induction of fibroblast growth factor: neural substrates for increased cognition associated with exercise. *Neuroscience* 85: 53-61
- Gonzalez-Scarano F, Baltuch G (1999) Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu.Rev.Neurosci.* 22:219-40

- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves AJ, Shors TJ (1999) Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat.Neurosci.* 2: 260
- Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E (1999a) Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96: 5263-5267
- Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG (1999b) Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 286: 548-552
- Gould E, Tanapat P, Hastings NB, Shors TJ (1999) Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. *Trends Cogn Sci.* 3: 186
- Gould E, Vail N, Wagers M, Gross CG (2001) Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 98: 10910-10917
- Graeber MB, Streit WJ (1990) Microglia: immune network in the CNS. *Brain Pathol.* 1: 2-5
- Greenough WT, Volkmar FR (1973) Pattern of dendritic branching in occipital cortex of rats reared in complex environments. *Exp.Neurol.* 40: 491
- Gross PM, Marcus ML, Heistad DD (1980) Regional distribution of cerebral blood flow during exercise in dogs. *J.Appl.Physiol.* 48: 213-217
- Hardman AE (2001) Physical activity and cancer risk. *Proc.Nutr.Soc.* 60: 107-113
- Hebb, DO (1949) *The Organisation of Behaviour: A Neuropsychological Theory.* Wiley, New York
- Hickey WF, Vass K, Lassmann H (1992) Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 51: 246-256
- Hommes OR, Leblond CP (1967) Mitotic division of neuroglia in the normal adult rat. *J.Comp Neurol.* 129: 269-278
- Horner PJ, Power AE, Kempermann G, Kuhn HG, Palmer TD, Winkler J, Thal LJ, Gage FH (2000) Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J.Neurosci.* 20: 2218-2228
- Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S (1998) Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 57: 1-9
- Jiang J, McMurtry J, Niedzwiecki D, Goldman SA (1998) Insulin-like growth factor-1 is a radial cell-associated neurotrophin that promotes neuronal recruitment from the adult songbird edpendyma/subependyma. *J.Neurobiol.* 36: 1-15
- Jiang W, Gu W, Brannstrom T, Rosqvist R, Wester P (2001) Cortical neurogenesis in adult rats after transient middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 32: 1201-1207
- Jones TA, Greenough WT (1996) Ultrastructural evidence for increased contact between astrocytes and synapses in rats reared in a complex environment. *Neurobiol.Learn.Mem.* 65: 48-56
- Jones TA, Hawrylak N, Greenough WT (1996) Rapid laminar-dependent changes in GFAP immunoreactive astrocytes in the visual cortex of rats reared in a complex environment. *Psychoneuroendocrinology* 21: 189-201
- Jonsdottir IH (2000) Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: neuropeptides and their interaction with exercise and immune function. *Immunol.Cell Biol.* 78: 562-570
- Kandel ER (2000) *Principles of Neural Science.* McGraw Hill

- Kaplan MS (1981) Neurogenesis in the 3-month-old rat visual cortex. *J.Comp Neurol.* 195: 323-338
- Kaplan MS, Hinds JW (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197: 1092-1094
- Kaplan MS, Hinds JW (1980) Gliogenesis of astrocytes and oligodendrocytes in the neocortical grey and white matter of the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *J.Comp Neurol.* 193: 711-727
- Kempermann G (2002) Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J.Neurosci.* 22: 635
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386: 493-495
- Kesslak JP, Nieto-Sampedro M, Globus J, Cotman CW (1986) Transplants of purified astrocytes promote behavioral recovery after frontal cortex ablation. *Exp.Neurol.* 92: 377-390
- Konigsmark BW, Sidman RL (1963) Origin of brain macrophages in the mouse. *J.Neuropath.* 22: 643
- Kornack DR, Rakic P (1999) Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96: 5768-5773
- Kornack DR, Rakic P (2001) Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. *Science* 294: 2127-2130
- Kraus-Ruppert R, Laissue J, Burki H, Odartchenko N (1973) Proliferation and turnover of glial cells in the forebrain of young adult mice as studied by repeated injections of 3 H-thymidine over a prolonged period of time. *J.Comp Neurol.* 148: 211-216
- Kreutzberg GW (1995) Microglia, the first line of defence in brain pathologies. *Arzneimittelforschung.* 45: 357-360
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19: 312-318
- Kuffler SW (1967) Neuroglial cells: physiological properties and a potassium mediated effect of neuronal activity on the glial membrane potential. *Proc.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 168: 1-21
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J.Neurosci.* 16: 2027-2033
- Lakatos A, Franklin RJ (2002) Transplant mediated repair of the central nervous system: an imminent solution? *Curr.Opin.Neurol.* 15: 701-705
- Lawson LJ, Perry VH, Gordon S (1992) Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 48: 405-415
- Le Belle JE, Svendsen CN (2002) Stem cells for neurodegenerative disorders: where can we go from here? *BioDrugs* 16: 389-401
- Lee JC, Mayer-Proschel M, Rao MS (2000) Gliogenesis in the central nervous system. *Glia* 30: 105-121
- Levine JM, Card JP (1987) Light and electron microscopic localization of a cell surface antigen (NG2) in the rat cerebellum: association with smooth protoplasmic astrocytes. *J.Neurosci.* 7: 2711-2720
- Levine JM, Reynolds R, Fawcett JW (2001) The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci.* 24: 39-47
- Levison SW, Chuang C, Abramson BJ, Goldman JE (1993) The migrational patterns

and developmental fates of glial precursors in the rat subventricular zone are temporally regulated. *Development* 119: 611-622

- Levison SW, Young GM, Goldman JE (1999) Cycling cells in the adult rat neocortex preferentially generate oligodendroglia. *J.Neurosci.Res.* 57: 435-446
- Lewis PD (1968) The fate of the subependymal cell in the adult rat brain, with a note on the origin of microglia. *Brain* 91: 721-736
- Ling EA, Leblond CP (1973) Investigation of glial cells in semithin sections. II. Variation with age in the numbers of the various glial cell types in rat cortex and corpus callosum. *J.Comp Neurol.* 149: 73-81
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90: 2074
- Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD (2000) Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405: 951-955
- Magavi SS, Macklis JD (2001) Manipulation of neural precursors in situ: induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Neuropsychopharmacology* 25: 816-835
- McTiernan A, Ulrich C, Slate S, Potter J (1998) Physical activity and cancer etiology: associations and mechanisms. *Cancer Causes Control* 9: 487-509
- Meshul CK, Seil FJ, Herndon RM (1987) Astrocytes play a role in regulation of synaptic density. *Brain Res.* 402: 139-145
- Miles MP, Leach SK, Kraemer WJ, Dohi K, Bush JA, Mastro AM (1998) Leukocyte adhesion molecule expression during intense resistance exercise. *J.Appl.Physiol.* 84: 1604-1609
- Moldoveanu AI, Shephard RJ, Shek PN (2001) The cytokine response to physical activity and training. *Sports Med.* 31: 115-144
- Mollgaard K, Diamond MC, Bennett EL, Rosenzweig MR, Lindner B (1971) Quantitative synaptic changes with differential experience in rat brain. *Int.J.Neurosci.* 2: 113
- Morshead CM, van der Kooy D (1992) Postmitotic death is the fate of constitutively proliferating cells in the subependymal layer of the adult mouse brain. *J.Neurosci.* 12: 249-256
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116: 201-211
- Nakajima K, Kohsaka S (2001) Microglia: activation and their significance in the central nervous system. *J.Biochem.(Tokyo)* 130: 169-175
- Newman EA, Frambach DA, Odette LL (1984) Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K⁺ siphoning. *Science* 225: 1174-1175
- Nieman DC (2001) Exercise immunology: nutritional countermeasures. *Can.J.Appl.Physiol.* 26 Suppl: S45-S55
- Nishiyama A (2001) NG2 cells in the brain: a novel glial cell population. *Hum.Cell* 14: 77-82
- Noetzel, Rox (1964) Autoradiographische Untersuchungen über Zellteilung und Zellentwicklung im Gehirn der erwachsenen Maus und der erwachsenen Rhesus-Affen nach Injektion von radioaktivem Thymidin. *Acta.Neuropathol* 3: 326
- Nottebohm F (2002) Why are some neurons replaced in adult brain? *J.Neurosci.* 22: 624-628

- Nowakowski RS, Hayes NL (2000) New neurons: extraordinary evidence or extraordinary conclusion? *Science* 288: 771
- Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW (1989) Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J.Neurocytol.* 18: 311-318
- Ortega RE (1994) Physiology and biochemistry: influence of exercise on phagocytosis. *Int.J.Sports Med.* 15 Suppl 3: S172-S178
- Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH (1999) Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J.Neurosci.* 19: 8487-8497
- Paterson JA (1983) Dividing and newly produced cells in the corpus callosum of adult mouse cerebrum as detected by light microscopic radioautography. *Anat.Anz.* 153: 149-168
- Pedersen BK (1991) Influence of physical activity on the cellular immune system: mechanisms of action. *Int.J.Sports Med.* 12 Suppl 1: S23-S29
- Perry VH, Gordon S (1988) Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci.* 11: 273-277
- Priller J, Flugel A, Wehner T, Boentert M, Haas CA, Prinz M, Fernandez-Klett F, Prass K, Bechmann I, de Boer BA, Frotscher M, Kreutzberg GW, Persons DA, Dirnagl U (2001) Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat.Med.* 7: 1356-1361
- Rakic P (1974) Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science* 183: 425
- Rakic P (1985) Limits of neurogenesis in primates. *Science* 227: 1054-1056
- Rakic P (2002) Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. *Nat.Rev.Neurosci.* 3: 65-71
- Reynolds R, Hardy R (1997) Oligodendroglial progenitors labeled with the O4 antibody persist in the adult rat cerebral cortex in vivo. *J.Neurosci.Res.* 47: 455-470
- Rocheffort C, Gheusi G, Vincent JD, Lledo PM (2002) Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J.Neurosci.* 22: 2679-2689
- Rosen GD, Williams AG, Capra JA, Connolly MT, Cruz B, Lu L, Airey DC, Kulkarni K, Williams RW (2000) The Mouse Brain Library @www.mbl.org. *Int Mouse Genome Conference* 14: 166
- Rosenzweig MR, Krech D, Bennett EL, Diamond MC (1962) Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy. *J.Comp.Physiol.Psychol.* 55: 429-437
- Rosenzweig MR, Bennett EL (1996) Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav.Brain Res.* 78: 57-65
- Sheedlo HJ, Sprinkle TJ (1983) The localization of 2':3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in bovine cerebrum by immunofluorescence. *Brain Res.* 288: 330-333
- Shephard RJ, Shek PN (1994) Potential impact of physical activity and sport on the immune system--a brief review. *Br.J.Sports Med.* 28: 247-255
- Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410: 372-376

- Sinden JD, Stroemer P, Grigoryan G, Patel S, French SJ, Hodges H (2000) Functional repair with neural stem cells. *Novartis.Found.Symp.* 231: 270-283
- Sirevaag AM, Greenough WT (1985) Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. II. Synaptic morphometry. *Brain Res.* 351: 215-226
- Sirevaag AM, Greenough WT (1991) Plasticity of GFAP-immunoreactive astrocyte size and number in visual cortex of rats reared in complex environments. *Brain Res.* 540: 273-278
- Song H, Stevens CF, Gage FH (2002) Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417: 39-44
- Stallcup WB (1981) The NG2 antigen, a putative lineage marker: immunofluorescent localization in primary cultures of rat brain. *Dev.Biol.* 83: 154-165
- Stewart R, Przyborski S (2002) Non-neural adult stem cells: tools for brain repair? *Bioessays* 24: 708-713
- Szeligo F, Leblond CP (1977) Response of the three main types of glial cells of cortex and corpus callosum in rats handled during suckling or exposed to enriched, control and impoverished environments following weaning. *J.Comp Neurol.* 172: 247
- Taylor CB, Sallis JF, Needle R (1985) The relation of physical activity and exercise to mental health. *Public Health Rep.* 100: 195-202
- Thomas WE (1992) Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 17: 61-74
- Turner AM, Greenough WT (1985) Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. I. Synaptic and neuronal density and synapses per neuron. *Brain Res.* 329: 195-203
- Tvede N, Heilmann C, Halkjaer-Kristensen J, Pedersen BK (1989) Mechanisms of B-lymphocyte suppression induced by acute physical exercise. *J.Clin.Lab Immunol.* 30: 169-173
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat.Neurosci.* 2: 266-270
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415: 1030-1034
- Vaughan DW, Peters A (1974) Neuroglial cells in the cerebral cortex of rats from young adulthood to old age: an electron microscope study. *J.Neurocytol.* 3: 405-429
- Vissing J, Andersen M, Diemer NH (1996) Exercise-induced changes in local cerebral glucose utilization in the rat. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 16: 729-736
- Volkmar FR, Greenough WT (1972) Rearing complexity affects branching of dendrites in the visual cortex of the rat. *Science* 176: 1145
- Walsh RN (1981) Effects of environmental complexity and deprivation on brain anatomy and histology: a review. *Int.J.Neurosci.* 12: 33-51
- Weicker H, Werle E (1991) Interaction between hormones and the immune system. *Int J.Sports Med.* 12 Suppl 1: S30-S37
- Weissman IL (2000) Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 287: 1442-1446
- Woods JA, Davis JM (1994) Exercise, monocyte/macrophage function, and cancer. *Med.Sci.Sports Exerc.* 26: 147-156

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. med. Gerd Kempermann für die Anregung zu dieser Arbeit und deren anhaltend geduldige, begeisterte und kompetente Unterstützung, die ganz wesentlichen Anteil am Gelingen der Arbeit hatte.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Neuronale Stammzellen“ am Max -Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, die mich immer wieder bei methodischen Problemen unterstützt und erhobene Befunde kritisch mit mir diskutiert haben.

Die Quantifizierung kortikaler BrdU+ Zellen hätte ich ohne die freundliche Aufnahme und ausgezeichneten Unterstützung durch PD Dr. rer. nat. H. Georg Kuhn und Dr. rer. nat. Christiana Cooper-Kuhn nicht an der Neurologischen Klinik der Universität Regensburg durchführen können.

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß die hier vorgelegte Dissertation von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Dan-Achim Ehninger